



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**Búsqueda de una firma molecular de microRNAs
para cáncer de próstata e hiperplasia prostática
benigna.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

ALBERTO IVAN SALIDO GUADARRAMA



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Prof. Marisol López López
VOCAL: Prof. Alicia Beatriz Cervantes Peredo
SECRETARIO: Prof. Mauricio Rodríguez Dorantes
1er. SUPLENTE: Prof. María Benita Leonor Fernández Salgado
2° SUPLENTE: Prof. Nancy Monroy Jaramillo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto Nacional de Medicina Geonómica (INMEGEN)

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes

(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S):

Alberto Ivan Salido Guadarrama

(nombre (s) y firma)

AGRADECIMIENTOS.

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por el espacio con el que fui honrado y por la oportunidad para crecer en lo profesional y en lo personal.

A mis profesores, por compartir su conocimiento y valiosa experiencia.

Al Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes, por su guía y confianza durante la realización de este trabajo, pero sobre todo, por su disposición y generosidad.

Al INMEGEN por el apoyo brindado para el desarrollo de este proyecto. En especial agradezco a la Dra. Claudia Rangel Escañero, por su tiempo, paciencia y su invaluable guía para el análisis y entendimiento de los datos generados.

A las profesoras Alicia Beatriz Cervantes Peredo y Marisol López López por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo y por sus valiosas aportaciones en la mejora del mismo.

A todas las personas que de una u otra forma me han acompañado lo largo de este camino, sufrido por momentos, pero mucho más grato y satisfactorio en lo general.

DEDICATORIA.

A mis padres, hermanos, tíos, primos, amigos. En fin, más que a mi familia por consanguinidad, a mi familia afectiva. Simplemente, no hay palabras que puedan expresar todo el cariño y la gratitud que siento hacia ustedes.

A los compañeros de la Facultad de Química. Por todas las experiencias y emociones compartidas.

A los compañeros del INMEGEN por el apoyo, ayuda y por la grata convivencia.

INDICE

1. LISTA DE FIGURAS.....	I
1. LISTA DE TABLAS.....	I
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Histología y patología de la próstata	3
2.2 Factores de riesgo para el cáncer de próstata.....	5
2.3 Pruebas de diagnóstico y marcadores moleculares para el cáncer de próstata	5
2.4 Biogénesis de microRNA	6
2.5 Mecanismo de acción de microRNA	8
2.6 Papel de los microRNA en la aparición y progresión del cáncer.....	10
2.7 MicroRNA con actividad oncogénica.....	12
2.8 MicroRNA con actividad supresora de tumores.....	12
2.9 Expresión aberrante de microRNA en cáncer de próstata	13
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVO.....	18
5.1. Objetivo general	18
5.1. Objetivos específicos	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1. Muestras clínicas.....	19
6.1.1. Colecta y procesamiento de muestras.....	19
6.1.2. Grupos del diseño experimental	19
6.2. Estudio de la expresión de miRNA en muestras de orina de pacientes con cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna	21
6.2.1. Extracción de RNA total y microRNA de muestras de orina	21
6.2.2. Transcripción reversa (RT) de microRNA.....	22
6.2.3. Pre-amplificación de microRNA	23
6.2.4. Cuantificación relativa de microRNA por PCR en tiempo real	23

7. RESULTADOS	25
7.1. Extracción de RNA y selección de muestras para cuantificación de microRNA.....	25
7.2. Cuantificación relativa y expresión diferencial de microRNA en cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna	26
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS	31
9. CONCLUSIONES.....	36
10. PERSPECTIVAS.....	37
11. BIBLIOGRAFÍA	37
APÉNDICE.....	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA DE LAS ZONAS DE LA PRÓSTATA Y SU PREDISPOSICIÓN A ENFERMEDADES	4
FIGURA 2. BIOGÉNESIS DE MIRNA.....	8
FIGURA 3. MECANISMO DE ACCIÓN DE MIRNA.	10
FIGURA 4. ALTERACIÓN DE MIRNA Y SUS CONSECUENCIAS SOBRE LA INICIACIÓN Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER.....	15
FIGURA 5. FORMACIÓN DE GRUPOS Y BLOQUES PARA ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	20
FIGURA 6. ESQUEMA DEL ARREGLO TLDA PARA ANÁLISIS DE MIRNA EN TIEMPO REAL.	25
FIGURA 7. EXPRESIÓN DE LOS CONTROLES ENDÓGENOS <i>RNU48</i> Y <i>MAMMU6</i> , EMPLEADOS COMO NORMALIZADORES PARA EL ANÁLISIS COMPARATIVO DE CT DE MIRNA..	27
FIGURA 8. GRÁFICA DE CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE 21 MICRORNA CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS DE EXPRESIÓN EN EL GRUPO DE CAP CON REFERENCIA AL GRUPO DE HPB..	30
FIGURA 9. MAPA DE CALOR MOSTRANDO EL AGRUPAMIENTO JERÁRQUICO NO SUPERVISADO BASADO EN EL GRUPO DE MICRORNA QUE MUESTRAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS DE EXPRESIÓN ENTRE EL GRUPO DE CAP Y EL DE HPB.	31

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. MIRNA QUE TIENEN EXPRESIÓN ALTERADA EN MUESTRAS CLÍNICAS DE CAP CON RESPECTO A CONTROLES DE TEJIDO NORMAL.	16
TABLA 2. MIRNA CON DIFERENCIA SIGNIFICATIVA DE EXPRESIÓN EN CAP Y SU LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA.....	29

1. RESUMEN.

El cáncer de próstata (CaP) es la segunda causa de muerte debida a neoplasia en países industrializados. En México, ~40% de los hombres entre 60 y 69 años sufren de este padecimiento. A la fecha, el antígeno prostático específico (PSA) sigue siendo el único marcador molecular empleado como indicador en la identificación y manejo de pacientes con CaP. Sin embargo, a pesar de su alta sensibilidad el PSA presenta una baja especificidad. Es por ello que se tiene la necesidad de encontrar nuevos marcadores que permitan diferenciar la hiperplasia prostática benigna (HPB) del CaP para disminuir la tasa de resultados falsos positivos y mejorar la detección temprana. Se ha establecido la importancia del papel crucial de los microRNA (miRNA) y las consecuencias de su alteración en la progresión del cáncer. Estudios recientes han revelado que es posible clasificar diferentes tipos de tumor con base en su perfil particular de microRNA. El objetivo de este estudio es evaluar la utilidad potencial de miRNA en orina como posibles indicadores de la enfermedad prostática. Se colectaron 36 muestras de orina provenientes de pacientes con diagnóstico positivo de CaP o HPB (hiperplasia prostática benigna) obtenidas después de la aplicación de examen recta digital (DRE). Se realizó la extracción de RNA total, haciendo uso del estuche comercial *RNAeasy Kit* (Quiagen Inc.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración de RNA se determinó por espectrofotometría a 260 nm, utilizando el equipo Nanodrop-1000. Se realizaron reacciones de RT y de pre-amplificación. La cuantificación relativa de miRNA se llevó a cabo por PCR en tiempo real utilizando el equipo ABI 7900HT y el arreglo *TaqMan low density array (TLDA)* (Applied Biosystems Inc.) que permite medir la expresión simultánea de 667 miRNA. Para el análisis estadístico de datos se utilizaron el *software DataAssist™* v 1.0 y el paquete *Bioconductor*. La cuantificación relativa de miRNA se determinó mediante el método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Las diferencias con un valor-p <0.05 se consideraron como estadísticamente significativas.

Después de normalizar los datos de Ct, utilizando como controles endógenos a los RNA pequeños: *MammU6* y *RNU48*, se realizó una prueba t para encontrar diferencias significativas en la expresión de microRNA entre el grupo de CaP y el de

HPB. Identificamos un grupo de 21 microRNA diferencialmente expresados. De este conjunto, *hsa-miR-150* y *hsa-miR-328* se encuentran subexpresados y el resto está sobre-expresado. Particularmente *hsa-miR-184* ha sido reportado previamente como sobre-expresado en perfiles de expresión de miRNA en CaP. Otro ejemplo es *hsa-miR-100*, también sobre-expresado en circulación, como lo reporta Mitchell et.al. (2008). La familia de microRNA *hsa-let7* está relacionada con la actividad supresora de tumores en condiciones fisiológicas normales y han sido reportados como subexpresados en CaP. De manera interesante, nosotros encontramos una regulación a la alta de varios miembros de la familia *hsa-let7* (*let-7b-c-d-e*). Un agrupamiento jerárquico supervisado muestra que el perfil de 21 miRNA seleccionados permite realizar una separación adecuada entre las 3 muestras del grupo de CaP y las 3 del grupo de HPB. Estos resultados, reflejan el uso potencial de miRNA obtenidos de muestras de orina como elementos de una firma molecular que permita distinguir a los individuos en riesgo de desarrollar CaP de aquellos con HPB.

2. INTRODUCCIÓN.

El Cáncer de Próstata (CaP) es el segundo tipo de neoplasia maligna más frecuente entre la población masculina. Las cifras más recientes indican que 782,600 nuevos casos fueron diagnosticados durante 2007 y el número de muertes asociadas a CaP durante ese año se estima en 254,000, lo que convierte al CaP en la sexta causa de muerte por cáncer en hombres, a nivel mundial (Garcia et al., 2007). La información más reciente indica que entre 2006 y 2007, el segundo tipo de neoplasia maligna que más egresos hospitalarios ocasionó en México fue el CaP. Más aun, en este mismo periodo, el CaP ocupó el primer lugar en cuanto a mayor número de muertes asociadas a neoplasias malignas (INEGI, 2009). Actualmente, las principales pruebas diagnósticas son la exploración rectal y la evaluación del antígeno específico prostático (PSA). Sin embargo, aún prevalece la dificultad para diagnosticar el cáncer de próstata en etapas tempranas, debido a que en muchas alteraciones no relacionadas al cáncer de próstata, por ejemplo, la hiperplasia benigna prostática (HPB), se presentan características que guardan gran semejanza con las lesiones del cáncer de próstata (De Marzo et al., 2003). Esto conduce a la necesidad de realizar monitoreos continuamente a lo largo de la vida de los pacientes para evaluar el posible desarrollo de CaP. Con el desarrollo de la tecnología genómica, los esfuerzos se han concentrado en el estudio a nivel molecular de factores que están implicados en la iniciación y progresión del cáncer en humanos.

2.1. Histología y patología de la próstata.

La próstata es un órgano pequeño de aproximadamente 20g, con forma semejante a la de una nuez. Produce el líquido prostático, elemento importante que proporciona soporte nutricional al semen. Anatómicamente se distinguen 5 zonas: rodeando la uretra, se encuentra la zona periuretral, que ocupa el 5% de la próstata; la zona central, cruzada por los conductos eyaculadores, que supone un 20% de la glándula; la zona transicional, que ocupa 5% del volumen glandular, es en esta zona donde la HPB ocurre casi de manera exclusiva; la zona fibromuscular y la zona periférica que ocupan un 70% del volumen glandular

(Figura 1). En la zona periférica se desarrollan el 68% de los casos de cáncer (Joshua et al., 2008).

Histológicamente la próstata consiste de dos tipos celulares principales: el estroma y el epitelio. El estroma está compuesto de células de músculo liso, fibroblastos y células endoteliales. Por otra parte, 4 subtipos celulares componen el epitelio: epitelio basal, epitelio secretor, células neuroendócrinas y células madre (DeMarzo et al., 2003). La etiología del CaP es multifactorial y compleja e involucra múltiples alteraciones a nivel molecular. Por otra parte, la hiperplasia prostática benigna (HPB) es un padecimiento que afecta a más del 50% de los hombres mayores de 60 años y su prevalencia aumenta con la edad hasta afectar a casi la totalidad de los hombres mayores de 80 años (Oelke and Gravias, 2010; Roehrborn, 2005).

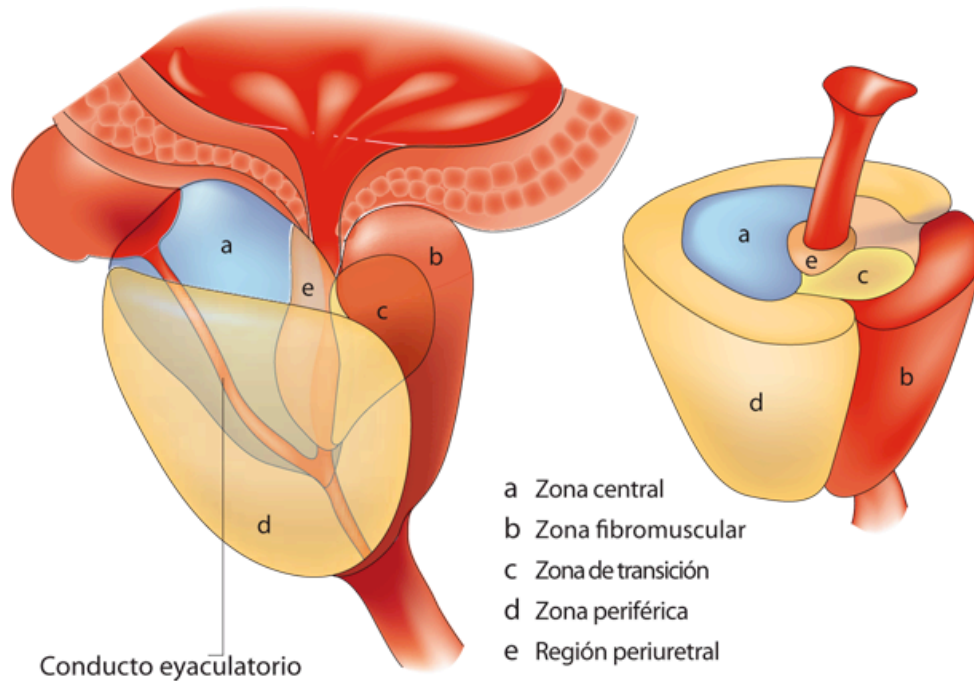


Figura 1. Esquema de las zonas de la próstata y su predisposición a enfermedades. La mayoría de las lesiones de cáncer ocurren en la zona periférica de la glándula, pocas ocurren en la zona de transición y casi ninguna en la zona central. La mayoría de las lesiones de HPB tienen lugar en la zona de transición. Adaptado de (De Marzo et al., 2007).

2.2. Factores de riesgo para el cáncer de próstata.

A pesar de la elevada tasa de morbilidad, a la fecha las causas exactas que llevan al desarrollo de adenocarcinoma prostático no han sido elucidadas. Tradicionalmente el CaP se ha asociado a factores como la edad avanzada, la etnicidad y la historia familiar. Por otra parte, se tiene conocimiento de muchos factores putativos de riesgo entre los que se encuentran los andrógenos, la dieta, el tabaquismo, el sedentarismo la actividad física, factores sexuales y la obesidad. Aunque los cambios en el estilo de vida y la prevención de la exposición a contaminantes químicos parecen ayudar a disminuir la incidencia de la enfermedad, su papel en la etiología del CaP no se ha establecido claramente (Schulz et al., 2003) . La patogénesis del cáncer involucra una interacción entre factores ambientales y genéticos. Más aun, se piensa que los factores genéticos contribuyen en un 42% al riesgo del desarrollo y progreso de la enfermedad (Rubin and De Marzo, 2004). Aunado a esto, los estudios más recientes indican que los andrógenos tienen un papel importante en el establecimiento de la enfermedad. Variaciones de genes que participan en la biosíntesis y metabolismo de estos andrógenos han sido asociadas con el desarrollo y progreso del CaP. El CaP cursa por diferentes estadios desde andrógeno dependiente a andrógeno independiente o refractario a terapia hormonal, siendo esta última fase la más agresiva y de mal pronóstico para el paciente (Pienta and Bradley, 2006).

2.3. Pruebas de diagnóstico y marcadores moleculares para el cáncer de próstata.

La identificación de marcadores moleculares asociados al CaP, constituye un aporte científico que ha mejorado la capacidad para detectar individuos en riesgo de padecer CaP. El marcador más utilizado actualmente para el diagnóstico de CaP es el antígeno prostático específico (PSA). El PSA es una glicoproteína que se produce de manera exclusiva en el epitelio de la próstata y está presente en cantidades pequeñas en el suero de varones sanos y se acumula con la edad. Los rangos de normalidad, sin embargo, depende de variables poblacionales o étnicas (Reynolds et al., 2007). A pesar de su alta sensibilidad, la prueba de niveles en

suero de PSA carece de especificidad ya que no permite establecer una diferencia confiable entre la HPB, el CaP de tipo agresivo y el no agresivo (You et al., 2010). A nivel genético, el *PCA3* ha tenido un papel significativo como marcador de diagnóstico no invasivo en orina. El *PCA3* es un mRNA específico de próstata, probablemente no codificante, cuya expresión se encuentra anormalmente elevada en neoplasias prostáticas, en comparación con tejidos adyacentes no-neoplásicos (Bussemakers et al., 1999). Otro marcador que ha sido reportado como altamente sobre-expresado en tejido de CaP es el gen que codifica para la proteína alfa metil CoA racemasa (*AMACR*) (Rubin et al., 2002). En un estudio reciente realizado con la finalidad de encontrar genes con eleva expresión en un conjunto de muestras de CaP se identificó a un gen de fusión presente en el 80% de los casos de CaP y ausente en tejido prostático benigno. Esta fusión involucra al gen *EGR*, miembro de la familia de genes *ETS*, que se une a la región 5' no traducida (UTR por su siglas en inglés) del gen *TMPRSS2*. Éste último codifica para una serín proteasa que responde a la señalización por andrógenos (Tomlins et al., 2008). A pesar del valor diagnóstico que presentan el mensajero *PCA3*, el gen *AMACR* y el gen de fusión *EGR-TMPRSS2*, no existe a la fecha un marcador histológico o molecular que permita hacer una predicción temprana del CaP con adecuada exactitud, en especial, del fenotipo agresivo del mismo.

2.4. Biogénesis de microRNA.

Los microRNA (miRNA) son secuencias cortas de RNA no codificantes, de 18 a 22 nucleótidos que se expresan en varios organismos eucariontes (Bushati and Cohen, 2007). Los primeros estudios revelaron que la expresión de los miRNA let-7 y lin-4 influye en el desarrollo y ciclo celular de *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993) y que la pérdida de su función altera su desarrollo normal. Estudios subsecuentes describen patrones de expresión de miRNA que son específicos de una etapa del desarrollo o de un tipo de tejido en especial en vertebrados (Lagos-Quintana et al., 2001). Estos hallazgos sugieren que los miRNA desempeñan un papel en el control de la expresión génica en eucariontes, al menos tan importante como el de los factores de transcripción.

El mecanismo de biogénesis de los miRNA (Figura 2) inicia con el procesamiento de un precursor primario (pri-miRNA) que puede estar contenido en diferentes regiones génicas; intrónicas, exónicas, o no traducidas (UTR). La RNA polimerasa II se encarga de la transcripción del pri-miRNA, el cual, al igual que un mRNA, se encuentra poliadenilado y tiene CAP en el extremo 5' (Cai et al., 2004). Cada pri-miRNA puede contener uno o más miRNA, cada uno dentro de una secuencia de 60 a 80 nucleótidos que se encuentra plegada sobre sí misma para formar una estructura en forma de horquilla, la cual es referida como pre-miRNA. Sin embargo, la mayoría de los pre-miRNA están organizados en agrupamientos dentro de una misma región cromosómica y presentan patrones de expresión similares, lo que sugiere que su transcripción se realiza en forma de policistrones que están regulados bajo un mismo promotor (Kim, 2005). A continuación, las horquillas de pre-miRNA son reconocidas y escindidas dentro del núcleo celular por la acción de un complejo microprocesador que incluye a la enzima Drosha y su elemento asociado DGCR8. Una vez escindido, el pre-miRNA en forma de horquilla, contiene un segmento de dos nucleótidos en el extremo 3' que es característico del corte producido por Drosha. Este rasgo permite al factor nuclear de exportación, conocido como exportina 5, reconocer al pre-miRNA y transportarlo al citoplasma en una forma dependiente de RAN guanosina trifosfato (Lund et al., 2004). Una vez en el citoplasma, otro complejo que incluye a la RNasa tipo III, Dicer, y a la proteína trans-activadora de unión a RNA (TRBP), realiza un segundo corte sobre el pre-miRNA para generar una molécula de RNA de doble cadena de 18 a 24 nucleótidos de longitud, que contiene dos miRNA maduros potenciales. Este dúplex de RNA se asocia a un complejo proteínico denominado complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Una de las dos cadenas de RNA es seleccionada por el RISC para actuar como cadena guía, esta cadena constituye el miRNA maduro. La cadena restante, también denominada cadena "pasajero" es degradada por la acción de la proteína Argonauta 2 (AGO 2) del complejo RISC. Se piensa que el RISC selecciona la cadena con menor estabilidad termodinámica de apareamiento como la cadena guía, al mismo tiempo que degrada a la cadena pasajero, más estable. Sin embargo, Ro y

colaboradores muestran evidencia de que ambas cadenas del dúplex de RNA son susceptibles de ser incorporadas al RISC y co-existir en ciertos tejidos, para actuar sobre diferentes poblaciones de mRNA (Ro et al., 2007).

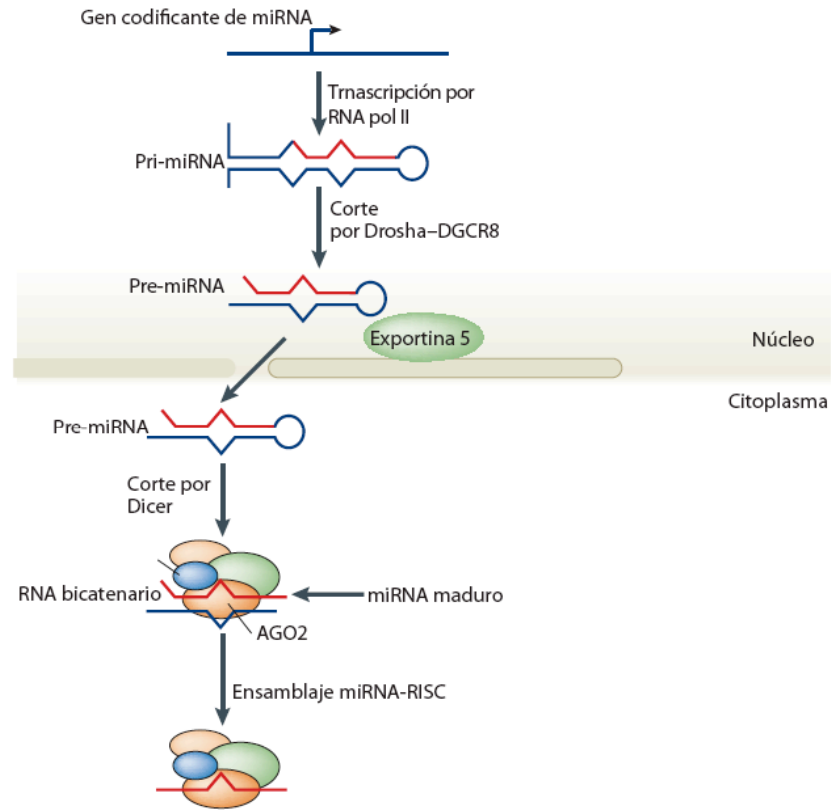


Figura 2. Biogénesis de miRNA. Un transcrito primario denominado pri-miRNA es generado por la RNA polimerasa II. El pri-miRNA es reconocido y procesado por el complejo de la RNAasa tipo II DROSHA y su cofactor DGCR8, lo que da lugar a un precursor denominado pre-miRNA. Finalmente el miRNA maduro es producido por la acción otra RNAasa tipo II, DICER; y es posteriormente integrado al complejo RISC para ejercer su acción. Adaptado de (Rana, 2007).

2.5. Mecanismo de acción de los microRNA.

De manera general, los miRNA establecen un apareamiento de bases con una secuencia de 6 a 8 nucleótidos que se localiza en la región 3'UTR del mRNA,

denominada secuencia semilla (Brennecke et al., 2005; Rajewsky and Socci, 2004). El apareamiento del miRNA con su mRNA blanco conduce a la degradación de este último o a la represión de su traducción (Figura 3). El grado de complementariedad entre el miRNA y su mRNA blanco determina el mecanismo de regulación. Si la complementariedad exhibida es perfecta, el miRNA induce la escisión del mRNA por acción del RISC. Usualmente, la escisión ocurre dentro de la región de complementariedad miRNA – mRNA y requiere de la participación de AGO2 (Liu et al., 2004). De manera alternativa, si la complementariedad es imperfecta, el RISC actúa silenciando ó bloqueando la traducción del mRNA. Este bloqueo no está del todo elucidado y parece llevarse a cabo durante la traducción, ya sea al inicio ó durante la etapa de elongación. Se ha demostrado que existe una represión del mecanismo de reconocimiento del CAP 5', en el que el miRNA impide la unión del factor de inicio de la traducción eIF4F. La represión de la traducción medida por miRNA, también puede ocurrir al inhibirse el ensamblaje de la subunidad ribosomal 60S al complejo de iniciación de la traducción (Filipowicz et al., 2008). Aquellos mRNA que han sido silenciados por los mecanismos mencionados son secuestrados dentro de un tipo de estructuras de procesamiento citoplasmáticas denominadas cuerpos P, en donde son almacenados y, finalmente, degradados por acción de proteínas que también se encuentra dentro de los cuerpos P, tales como las enzimas que degradan el CAP 5' Dcp1/Dcp2 y la exonucleasa 3'→5' Xrn1; y las que eliminan progresivamente la poliadenialción en 3' como el complejo Ccr4p/Pop2p/Not. De hecho, todo el conjunto del RISC se encuentra también dentro de estos cuerpos P, por lo que éste también puede ensamblar la maquinaria que conlleva al decaimiento de los mRNA (Parker and Sheth, 2007; Fabian et al., 2010). De manera interesante, la versatilidad en el modo de acción de los miRNA no se limita a inhibir la expresión génica de ciertos productos biológicamente funcionales. También se ha demostrado que, de manera opuesta, su presencia y asociación a otros factores, p.ej. la proteína relacionada al síndrome del X frágil, puede inducir e incrementar la traducción del transcrito sobre el que ejercen su efecto, más que impedirlo (Vasudevan et al., 2007).

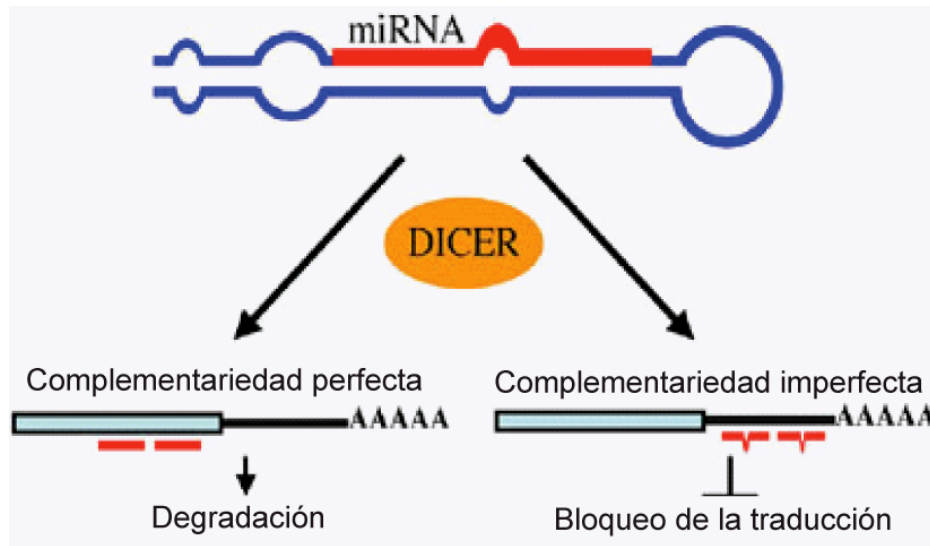


Figura 3. Mecanismo de acción de miRNA. El complejo miRNA-RISC dirige la acción de represión de la traducción del transcrito blanco. Si el nivel de complementariedad entre el miRNA y la región semilla del transcrito, este es degradado. Si es incompleta, se produce un bloqueo de la traducción. Adaptado de Rana, 2007.

2.6. Papel de los microRNA en la aparición y progresión del cáncer.

El crecimiento celular durante el desarrollo animal depende de señales moleculares que coordinan cuidadosamente los procesos de proliferación y de muerte celular, y la velocidad a la cual estos se llevan a cabo. Sin embargo, el cáncer se caracteriza por un crecimiento celular en el cual la identidad de las células se ha perdido, existe proliferación extensa y alteración del proceso de muerte celular. Interesantemente, las primeras pistas de la asociación entre los miRNA y la presencia de un fenotipo cancerígeno en humanos provinieron de los estudios mencionados en *C. elegans*. La demostración de que la pérdida de la función de *lin-4* resulta en anomalías en la diferenciación de linajes celulares específicos del nemátodo (Wightman et al., 1993), condujo a establecer una analogía con los procesos de formación de tumores en los que existe una falla en la ejecución del programa de diferenciación celular. Posteriormente, estudios

realizados en *Drosophila* mostraron que el miRNA *bantam* estimula la proliferación celular y, al mismo tiempo, previene la apoptosis (Brennecke et al., 2003), lo que sugiere que los homólogos putativos de *bantam* en vertebrados podrían actuar como oncogenes.

El vínculo más directo entre la función de miRNA y el cáncer en humanos fue quizá demostrado en el estudio realizado por Calin y colaboradores en 2002. En dicho estudio se observó que miR-15a y miR-16-1 se encuentran codificados en la región cromosómica 13q14, que frecuentemente se encuentra deletada en pacientes con leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (B-CLL). Por consiguiente, *miR-15a* y *miR-16-1* se encuentran ausentes o sub-expresados en tejidos de pacientes con B-CLL (Calin et al., 2002). Más aun, posteriormente se reportó que ambos miRNA tenían como blanco de acción la región 3'UTR del transcrito del gen *BCL2*, el cual resulta ser un potente inhibidor de la apoptosis (Cimmino et al., 2005). Lo anterior sugiere contundentemente una actividad supresora de tumores para estos dos miRNA. Posteriormente, se demostró la expresión de una firma molecular específica de 13 miRNA, que incluye a *miR-15a* y *miR-16-1*, asociada a la aparición y progreso de la B-CLL (Calin et al., 2005).

Más de la mitad de los miRNA se encuentran localizados en regiones del genoma humano susceptibles de sufrir amplificaciones, deleciones o rearrreglos en tumores malignos, lo que refuerza las hipótesis acerca del importante papel de los miRNA en la patogénesis del cáncer (Calin et al., 2004). Por otra parte, estudios subsecuentes han mostrado que los perfiles de expresión de los miRNA proporcionan información importante acerca del estado de diferenciación y el linaje celular en diferentes tipos de tumores. Estos perfiles de expresión de miRNA, también permiten la clasificación del tejido de origen de tumores pobremente diferenciados con mayor exactitud que la que permite el análisis de expresión de mRNA de las mismas muestras (Lu et al., 2005). Con base en esta información, podría decirse que la historia del desarrollo de un tumor está reflejada en su patrón de expresión de miRNA particular. En el estudio mencionado, también se muestra que más de la mitad de los miRNA examinados se encuentran expresados a un nivel inferior en tumores, en comparación con tejidos sanos del

mismo tipo e independientemente del tipo celular, lo que refleja el papel de los miRNA en la diferenciación celular terminal y que la diferenciación incompleta en células cancerosas está fuertemente asociada a la disminución en su expresión.

2.7. MicroRNA con actividad oncogénica.

Aquellos miRNA que contribuyen a la proliferación celular y la actividad anti-apoptótica se dice que son promotores de la actividad oncogénica y, por lo tanto, están sobre-expresados en células tumorales. Uno de los ejemplos más conocidos de un miRNA con actividad oncogénica es *miR-21*, el cual se encuentra sobre-expresado en una gran variedad de tumores, incluyendo al cáncer de mama, el hepatocelular y el colorectal. Dos de los blancos identificados para *miR-21* son los genes: homólogo de fosfatasa y tensina (*PTEN*) y de muerte celular programada 4 *PDCD4*, ambos con actividad supresora de tumores y que están implicados en procesos invasivos y metastásicos (Asangani et al., 2008; Meng et al., 2007; Zhu et al., 2008). Otro, es el ejemplo de un *locus* con propiedades de oncogén. Se trata del agrupamiento *mir-17-92*, que codifica a siete miRNA, se encuentra localizado en un intrón dentro de la región del cromosoma humano 13q31.3 y frecuentemente está amplificado en diversos tipos de linfomas y tumores sólidos (Hayashita et al., 2005). En general, la información acerca de los miRNA oncogénicos indica que su función principal consiste en regular negativamente a genes supresores de tumores que al estar disminuidos favorecen los procesos invasivos y de metástasis en el cáncer.

2.8. MicroRNA con actividad supresora de tumores.

Aquellos miRNA que presentan actividad que previene la proliferación celular y promueve la apoptosis se pueden categorizar como supresores de tumores. Por lo general, la expresión de estos miRNA se encuentra disminuida en células cancerosas, en comparación con las de tejido sano. Además de los ya mencionados *miR-15a* y *miR-16-1*, existen otros ejemplos de este tipo de miRNA. La familia *let-7* consiste en un grupo altamente conservado en muchas especies, incluyendo a *C. elegans*, *Drosophila*, y vertebrados. Dentro de esta familia, *let-7* es

un miRNA que ejerce una regulación negativa sobre tres genes *RAS*, conocidos oncogenes, en humanos. La expresión de *let-7* se encuentra significativamente disminuida en tejidos de tumor pulmonar y la expresión de la proteína RAS incrementada, en relación al tejido normal (Johnson et al., 2007; Johnson et al., 2005). Se han reportado otros blancos de *let-7*, como el transcrito del gen *HMGA2* que tiene un conocido función oncogénico en una gran variedad de tumores. Éste es un ejemplo en el que la supresión de un oncogén por la acción de un miRNA se ve superada en células tumorales por una sobre-expresión del gen *HMGA2*, con una translocación que elimina la región 3'UTR complementaria a *let-7*, lo que impide que este último ejerza su acción de regulación negativa (Lee and Dutta, 2007). Los miRNA, en teoría, pueden actuar sobre más de un mRNA; por lo tanto, un mismo miRNA podría tener acciones potenciales como un oncogén, si su blanco es el transcrito de un gen supresor de tumor o como un supresor de tumores, si su blanco es el transcrito de un oncogén. Aunque se ha encontrado que la expresión diferencial de muchos miRNA en células cancerosas es significativa, a la fecha no se conoce con exactitud su función ni la totalidad de sus blancos moleculares. En la figura 4 se presenta un esquema que muestra de manera general la asociación entre la expresión de miRNA y su alteración en cáncer.

2.9. Expresión aberrante de microRNA en cáncer de próstata.

La progresión del CaP es un proceso que implica múltiples alteraciones moleculares, muchas de las cuales se reflejan en cambios de la expresión genética de las células. Debido al papel regulatorio de los miRNA en la expresión de diversos genes y a su especificidad tisular, es evidente que la identificación de miRNA relacionados al CaP podría aportar información valiosa sobre las alteraciones moleculares asociadas a la patogénesis del CaP. Recientemente, se han reportado diversos estudios de la expresión de miRNA en muestras clínicas de CaP. En un trabajo sobre el perfil de expresión de 228 miRNA en 56 muestras de CaP y 7 de tejido prostático normal, se logró identificar la expresión diferencial significativa de 42 miRNA. De los miRNA identificados, 39 (87%) se encontraban

sobre-expresados y 6 (13%) estaban sub-expresados, en las muestras de CaP (Volinia et al., 2006). Alternativamente, en otro estudio, analizaron el perfil de expresión para 319 miRNA en 9 muestras de CaP y 4 de HPB y lograron detectar 50 miRNA expresados diferencialmente. De éstos, 36 (72%) mostraron estar sub-expresados en muestras de CaP, mientras que 14 (28%) se encontraban sobre-expresados en las mismas muestras (Porkka et al., 2007). Entre estos dos estudios existen discrepancias que pueden ser atribuidas en gran medida a las diferentes metodologías aplicadas, lo que indica que el análisis del perfil de expresión de miRNA en muestras clínicas de CaP no es un asunto trivial. Reportes más recientes han mostrado que la expresión de miRNA se encuentra regulada a la baja de manera significativa en tejidos de CaP con respecto a tejido prostático benigno (Ambs et al., 2008; Tong et al., 2009), datos que coinciden con los reportados en el trabajo de Porkka et al. (2007) (Tabla 1). Interesantemente, dicho trabajo mostró que es posible separar a las muestras de HPB de las de CaP, con base en su perfil de expresión particular de miRNA. Más aun, las muestras de carcinomas fueron clasificadas de acuerdo a su dependencia androgénica. Teniendo cuatro de los cinco carcinomas sin tratamiento hormonal agrupados en un subgrupo; mientras que los cuatro refractarios a terapia hormonal, se localizaron dentro un subgrupo propio. Esto muestra que la expresión de los miRNA en un tejido tumoral pueden proporcionar información valiosa que permita su clasificación y que puede ser aprovechada en el desarrollo de nuevas tecnologías de diagnóstico de tipos de cáncer que actualmente carecen de marcadores moleculares exactos, como en el caso del CaP.

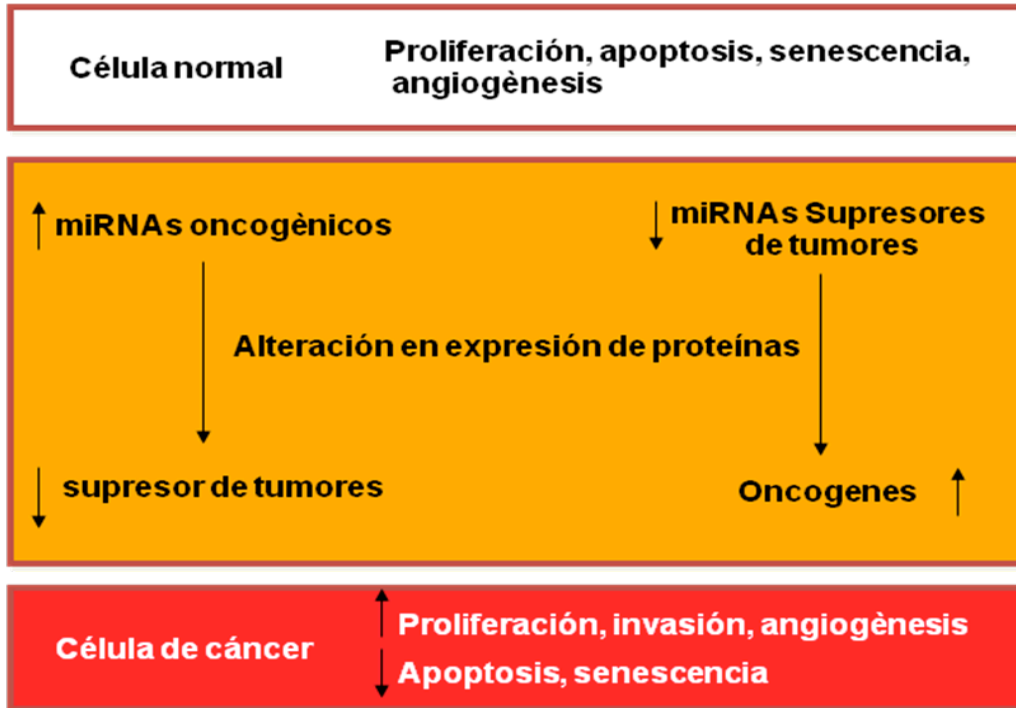


Figura 4. Alteración de miRNA y sus consecuencias sobre la iniciación y progresión del cáncer. La acción de un miRNA puede considerarse oncogénica, si sus blancos son transcritos que codifican para supresores de tumores. Si, por el contrario, sus blancos son transcritos de oncogenes, se considera como un miRNA con acción de supresor de tumor.

Tabla 1. MiRNA que tienen expresión alterada en muestras clínicas de CaP con respecto a controles de tejido normal.

(Volinia et al., 2006)		(Porkka et al., 2007)				(Tong et al., 2009)	(Ambs et al., 2008)						
Sobre-expresados	Sub-expresados	Sobre-expresados	Sub-expresados		Sub-expresados	Sobre-expresados	Sub-expresados						
En todos los carcinomas		En todos los carcinomas											
(39 miRNA)		(6 miRNA)		(14 miRNA)		(36 miRNA)		(5 miRNA)		(20 miRNA)		(20 miRNA)	
<i>let-7d*</i>	<i>miR-106a</i>	<i>let-7a**</i>	<i>miR-202</i>	<i>let-7a**</i>	<i>miR-143</i>	<i>miR-23b**</i>	<i>miR-182</i>	<i>miR-494</i>					
<i>let-7i **</i>	<i>miR-124a</i>	<i>miR-24</i>	<i>miR-210</i>	<i>let-7b</i>	<i>miR-145</i>	<i>miR-100</i>	<i>miR-31</i>	<i>miR-490</i>					
<i>miR-16*</i>	<i>miR-135</i>	<i>miR-29a</i>	<i>miR-296</i>	<i>let-7c</i>	<i>miR-195*</i>	<i>miR-145**</i>	<i>miR-26a-1/2</i>	<i>miR-133a-1</i>					
<i>miR-17-5p</i>	<i>miR-146</i>	<i>miR-128a</i>	<i>miR-320</i>	<i>let-7d*</i>	<i>miR-199a</i>	<i>miR-221**</i>	<i>miR-200c</i>	<i>miR-1-2</i>					
<i>miR-20a</i>	<i>miR-148</i>	<i>miR-149</i>	<i>miR-370</i>	<i>let-7g</i>	<i>miR-221</i>	<i>miR-222**</i>	<i>miR-375</i>	<i>miR-218-2</i>					
<i>miR-21</i>	<i>miR-181b</i>	<i>miR-218</i>	<i>miR-373</i>	<i>miR-16*</i>	<i>miR-222</i>		<i>miR-196a-1/2</i>	<i>miR-220</i>					
<i>miR-25**</i>	<i>miR-184**</i>		<i>miR-498</i>	<i>miR-23a</i>	<i>miR-497</i>		<i>miR-370</i>	<i>miR-128a</i>					
<i>miR-26a*</i>	<i>miR-187</i>		<i>miR-503</i>	<i>miR-23b</i>			<i>miR-425</i>	<i>miR-221</i>					
<i>miR-27a*</i>	<i>miR-191</i>			<i>miR-26a*</i>			<i>miR-194-1/2</i>	<i>miR-499</i>					
<i>miR-29a*</i>	<i>miR-195*</i>			<i>miR-92*</i>			<i>miR-181a-1/2</i>	<i>miR-329</i>					
<i>miR-29b*</i>	<i>miR-196</i>			<i>miR-99</i>			<i>miR-34b</i>	<i>miR-340</i>					
<i>miR-30c*</i>	<i>miR-197</i>			<i>miR-103</i>			<i>let-7i**</i>	<i>miR-345</i>					
<i>miR-32</i>	<i>miR-198**</i>			<i>miR-125a</i>			<i>miR-188</i>	<i>miR-410</i>					
<i>miR-34a</i>	<i>miR-199</i>			<i>miR-125b</i>			<i>miR-25**</i>	<i>miR-126</i>					
<i>miR-92*</i>	<i>miR-203</i>			En carcinomas refractarios a terapia hormonal			<i>miR-106b</i>	<i>miR-205</i>					
<i>miR-93**</i>	<i>miR-206</i>		<i>miR-184**</i>	<i>let-7f</i>	<i>miR-30a_5p</i>		<i>miR-449</i>	<i>miR-7-1/2</i>					
<i>miR-95</i>	<i>miR-214</i>		<i>miR-198**</i>	<i>miR-19b</i>	<i>miR-30b</i>		<i>miR-99b</i>	<i>miR-145**</i>					
<i>miR-101</i>	<i>miR-223</i>		<i>miR-302c</i>	<i>miR-22</i>	<i>miR-30c</i>		<i>miR-93**</i>	<i>miR-34a</i>					
			<i>miR-345</i>	<i>miR-26b</i>	<i>miR-100</i>		<i>miR-92-1/2</i>	<i>miR-487</i>					
			<i>miR-491</i>	<i>miR-27a</i>	<i>miR-141</i>		<i>miR-125a</i>	<i>let-7b</i>					
			<i>miR-513</i>	<i>miR-27b</i>	<i>miR-148a</i>								
				<i>miR-29a</i>	<i>miR-205</i>								
				<i>miR-29b</i>									

**Expresión idéntica entre dos ó más estudios; *discrepancia en el resultado de expresión entre dos o más estudios.

3. JUSTIFICACIÓN.

El CaP ha mostrado un incremento en el número de casos durante los últimos años y presenta elevadas tasas de mortalidad alrededor del mundo, incluyendo a México. Por otra parte, la hiperplasia prostática benigna es un padecimiento que afecta a más del 50% de los hombres mayores de 60 años y su prevalencia aumenta con la edad. Clínicamente, los rasgos y síntomas que caracterizan a la HPB son casi indistinguibles de los del CaP, particularmente durante las primeras etapas del desarrollo de las lesiones prostáticas, lo cual dificulta el diagnóstico acertado. Este problema es aún mayor si se considera que las estrategias de detección oportuna son invasivas, con una alta morbilidad asociada y no permiten establecer con certeza la diferencia entre CaP y la HPB. El lograr establecer dicha diferencia constituye un valioso aporte científico que permitirá identificar a los sujetos en riesgo de desarrollar CaP y dar un mejor seguimiento médico a su evolución. Evitando, al mismo tiempo, que los pacientes con HPB sean sometidos a tratamientos dolorosos e innecesarios. Es por ello, que la identificación potencial de miRNA como elementos constitutivos de la firma molecular de HPB y CaP, en un fluido como la orina, representa una posible herramienta que contribuya al desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico oportuno, no invasivo y acertado de la enfermedad prostática.

4. HIPÓTESIS.

La citología tanto de BPH como el CaP presentan un crecimiento de células anormal, y se ha establecido que en un fluido como la orina es posible identificar una gran cantidad de estas células. Por otro lado se sabe que la expresión de genes que influyen en el desarrollo de la enfermedad puede estar regulada por moléculas pequeñas como los miRNA, entonces es posible la identificación en orina de un conjunto de miRNA cuyo patrón de expresión sea característico de CaP.

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo General.

Evaluar el perfil de expresión de microRNA en muestras de orina como elementos constitutivos de la firma molecular diferencial de HPB y CaP

5.2. Objetivos particulares.

- Realizar el aislamiento y purificación de microRNA, a partir de muestras de orina, provenientes de pacientes con diagnóstico positivo para HPB y CaP.
- Determinar la diferencia en la expresión de microRNA entre los grupos de CaP y de HPB, utilizando el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$.
- Determinar la correlación entre los perfiles de expresión de microRNA, y el diagnóstico positivo correspondiente, que permita proponer una firma molecular basada en miRNA para CaP y HPB.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Muestras clínicas.

6.1.1. Colecta y procesamiento de muestras.

Las muestras de orina se obtuvieron de pacientes que acuden al servicio de Urología del Hospital General Manuel Gea González; Ciudad de México, México. Todos los participantes fueron informados y proporcionaron su consentimiento informado para la realización de este estudio. La población de estudio consistió de hombres con diagnóstico clínico de CaP, con grado Gleason promedio de 7 (intervalo: 6 a 8) y hombres con diagnóstico clínico de HPB. La edad promedio de los pacientes sometidos al estudio fué de 67 años (intervalo: 50 a 87 años). La colecta de muestras se realizó de la siguiente manera: después de la aplicación de masaje prostático rectal (DRE) realizado por un médico urólogo, se colectaron 30 mL de orina. Las muestras de orina se mezclaron con 5 mL de una solución amortiguadora (RNAlater® RNA Stabilization Reagent, AMBION, Austin TX, USA) para estabilización del RNA y se mantuvieron en refrigeración a -70°C hasta la extracción del mismo.

6.1.2. Grupos del diseño experimental.

Las muestras se clasificaron en dos grupos: CaP e HPB. Con la finalidad de optimizar los ensayos de cuantificación por PCR en tiempo real, en cada grupo se conformaron 3 bloques constituidos por 3 muestras cada uno, para un total de 9 muestras por grupo (Figura 5). La cantidad de RNA en cada bloque se mantuvo aproximadamente constante (70 a 75 nanogramos) en un volumen final de 3 microlitros y se llevó a cabo el análisis de cuantificación por triplicado.

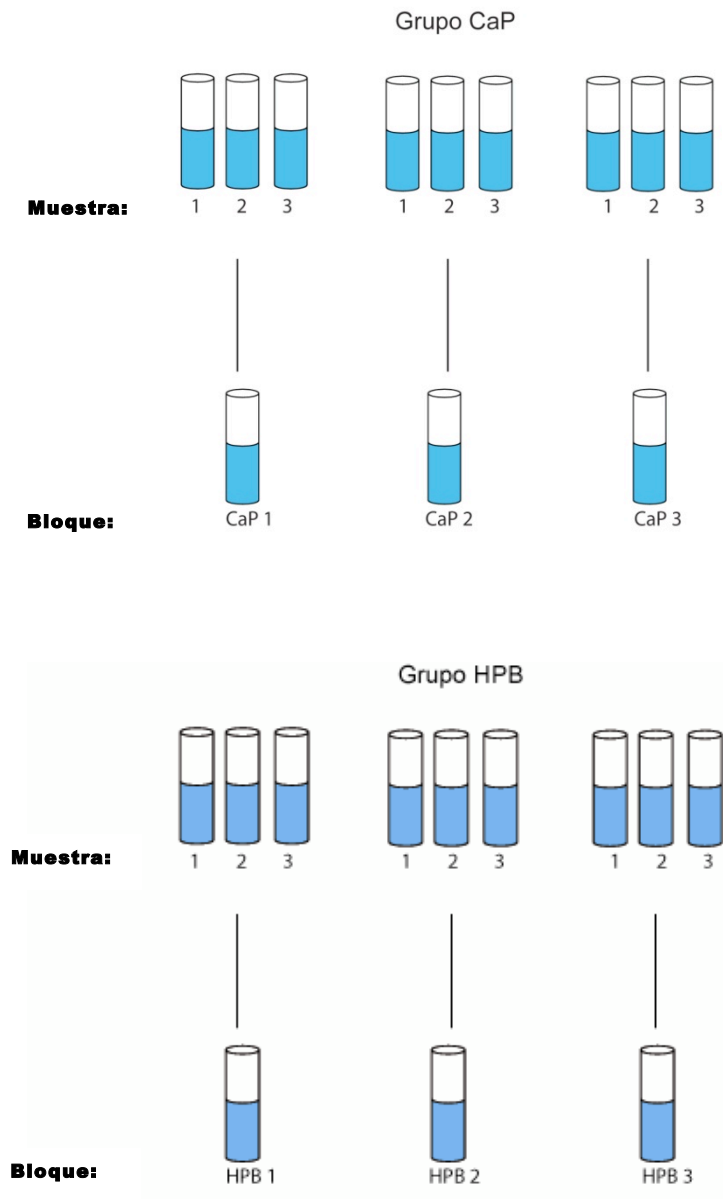


Figura 5. Formación de grupos y bloques para análisis de muestras. Combinación aleatoria en bloques de 3 muestras para cada grupo, CaP e HPB. Cada bloque fue analizado por triplicado.

6.2. Estudio de la expresión de miRNA en muestras de orina de pacientes con cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna.

6.2.1. Extracción de RNA total y microRNA de muestras de orina.

Cada muestra se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 minutos a 15°C y se decantó el sobrenadante para obtener una pastilla que contiene el paquete celular. La pastilla se lavó, agregando 10 mL de PBS (solución salina amortiguadora de fosfatos) a pH= 7.4; se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos a 15°C y se decantó el sobrenadante.

A continuación se prosiguió con el protocolo del estuche comercial (RNeasy® Mini Kit, Qiagen Inc., Valencia CA, USA). El protocolo considera que el RNA se aísla y purifica gracias a las condiciones que permiten su unión selectiva a una membrana de sílica. Primero, se disolvió la pastilla en 400 µL de amortiguador RLT para favorecer la lisis celular y se agitó en vortex para homogenizar la muestra. Con la finalidad de incrementar la selectividad de la unión del RNA con la matriz de sílice, se añadieron 400 µL de Etanol al 70%. Posteriormente, se vertieron 400 µL de la muestra en una columna, donde el RNA se une a la membrana, colocada previamente sobre un tubo de recolección de 2 mL; se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos y se descartó el sobrenadante. Este paso se repitió hasta eluir el volumen total de muestra por la columna. Posteriormente, se añadió un volumen de 700 µL de amortiguador RW1 para lavar la columna, se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos y se descartó el tubo con el sobrenadante. Se transfirió la columna a un nuevo tubo de recolección de 2 mL. Se realizó un lavado con 500 µL de amortiguador RPE, se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos y se decantó el sobrenadante. Nuevamente, se agregaron 500 µL de amortiguador RPE y se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos. Se decantó el sobrenadante y se centrifugó a 10,000 rpm durante 30

segundos. La columna se transfirió a un tubo de 1.5 mL con tapa y se agregaron 10 µL de agua libre de RNAsas en el centro de la columna sin tocar la membrana, para eluir el RNA. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto. Una vez colectada la elusión, la concentración de RNA se determinó por medición espectrofotométrica a 260 nm, empleando el equipo NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA USA). Para evaluar la calidad de la extracción se utilizó la proporción de las absorbancias 260nm/280nm.

6.2.2. Transcripción reversa (RT) de microRNA.

La reacción de RT se realizó haciendo uso del estuche comercial, TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit, (Applied Biosystems Llc, Foster City, CA USA). La técnica de RT para fragmentos de RNA mayores a 200 pb, permite su transcripción a cDNA, mediante el uso de cebadores lineales. La diferencia fundamental, en este caso, es el uso de cebadores con diseño de tallo y asa que se unen al extremo 3' del miRNA durante la reacción de RT lo que incrementa la especificidad y la capacidad de discriminar entre secuencias de miRNA maduros muy similares. En segundo lugar, la estructura de doble cadena de la porción de tallo previene que los cebadores formen un apareamiento con precursores de miRNA. Finalmente, la base que proporciona la porción de asa aumenta la estabilidad del heterodúplex de miRNA y DNA, lo que mejora la eficiencia de la reacción de RT.

La reacción de RT se realizó a partir de 75 ng de RNA total aislado. Se utilizaron 0.8 µL de los cebadores RT primers Megaplex™ (10x), 0.2 µL de dNTPs con dTTP (100mM), 1.5 µL de la Transcriptasa reversa Multiscribe (50 U/µL), 0.8 µL de solución amortiguadora para RT (10x), 0.8 µL de MgCl₂ (25mM), 0.1 µL de Inhibidor de RNAsa (20U/ µL) y 0.2 µL de H₂O libre de nucleasas, todos ellos reactivos del estuche comercial mencionado. La reacción, en un volumen final de 7.5, se incubó en el equipo termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems Llc, Foster City, CA USA) bajo las siguientes condiciones: 16 °C por 2

min (alineamiento de los cebadores); seguido de 40 ciclos a 42 °C por 1 min y 50°C por 1 seg (transcripción reversa); e inactivación de la reacción a 85°C por 5 min.

6.2.3. Pre-amplificación de microRNA.

En la reacción de pre-amplificación, el cDNA producto de la reacción de RT es empleado como molde para la generación de una segunda hebra de cDNA mediante la acción de una DNA polimerasa y de esta manera mejorar la capacidad de detectar cantidades pequeñas de miRNA durante la cuantificación por PCR en tiempo real. Para la reacción se empleó el estuche comercial TaqMan® PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystems Llc, Foster City, CA USA) En un tubo de microcentrifuga se mezclaron 12.50 µL del concentrado Mastermix TaqMan (2x), 2.50 µL de cebadores Megaplex™ PreAmp Primers (10x), 2.50 µL del producto de la RT y 7.50 µL de H₂O libre de nucleasas; para obtener un volumen final de 25 µL. La reacción se preparó por triplicado y se incubó en el mismo equipo empleado para la reacción de RT, bajo las siguientes condiciones de termociclado: 95°C por 10 min, 55 °C por 2 min y 72 °C por 2 min (activación de la enzima DNA polimerasa), seguidos por 12 ciclos de 95 °C por 15 min (desnaturalización) y 60 °C por 4 min (alineamiento y extensión), finalizando con 99.9 °C por 1 seg para inactivar la reacción.

6.2.4. Cuantificación relativa de microRNA por PCR en tiempo real.

El principio del ensayo comercial empleado para la detección y cuantificación de miRNA por PCR en tiempo real (TaqMan™ MicroRNA Assays, Applied Biosystems Llc, Foster City, CA USA), se basa en el sistema TaqMan™, en el que se emplean sondas que incorporan en su extremo 5' un fluoróforo reportero y en el extremo 3', un adaptador que favorece la especificidad de la unión con el templado.

El ensayo de cuantificación de microRNA por PCR en tiempo real se llevó a cabo utilizando la plataforma de arreglos de baja densidad TaqMan® Human MicroRNA Cards v2.0 (Applied Biosystems Llc, Foster City, CA USA). La plataforma contiene

sondas con diseño TaqMan™ para la identificación de 667 miRNA específicos de humano, previamente validadas en cuanto a la falta de reactividad cruzada entre diferentes miRNA. También incluye sondas para la detección de tres RNA nucleares pequeños (*MammU6*, *RNU44* y *RNU48*), utilizados como controles endógenos positivos para la cuantificación y comparación de los resultados entre diferentes muestras; más 5 sondas para miRNA de planta y ratón, utilizados como controles negativos (*ath-miR159a*, *mmu-miR-672*, *mmu-miR-674*, *mmu-miR-871* y *mmu-miR-872*) (figura 6). La reacción se preparó utilizando 450 μ L de concentrado de la mezcla maestra universal de PCR TaqMan™, 9 μ L del producto de la pre-amplificación y 441 μ L de H₂O libre de nucleasas, para obtener un volumen final de 900 μ L.

Par cada ensayo, la mezcla de reacción se colocó en una placa de arreglos. Se centrifugó a 331g durante un minuto. La amplificación por PCR y detección en tiempo real se realizó en el equipo ABI 7900HT Real Time PCR System (Applied Biosystems Llc, Foster City, CA USA) bajo las siguientes condiciones de termociclado: 50°C por 2 min y 95°C por 15 seg (activación), seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 1 min (desnaturalización) y 60 °C por 2 min (alineamiento y extensión). Las lecturas realizadas por el equipo son corregidas con respecto a una línea base de la señal (p. ej. eliminación del ruido de fondo) y transformadas a valores de Ct. Para identificar miRNA con diferencia de expresión, se realizó una cuantificación relativa de microRNA mediante análisis comparativo de los valores de C_T entre las muestras con HPB y CaP ó método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Apendice A), utilizando el software Data assist DataAssist™ (Applied Biosystems Llc, Foster City, CA USA) y el código Bioconductor del entorno de programación R. Dicho método permite normalizar la fluorescencia detectada durante el proceso de amplificación, respecto a un control endógeno y reportar la cantidad de miRNA en la muestra problema con respecto a un estándar; en este caso, CaP e HPB, respectivamente. Para determinar cambios estadísticamente significativos se aplicó una prueba t de student.

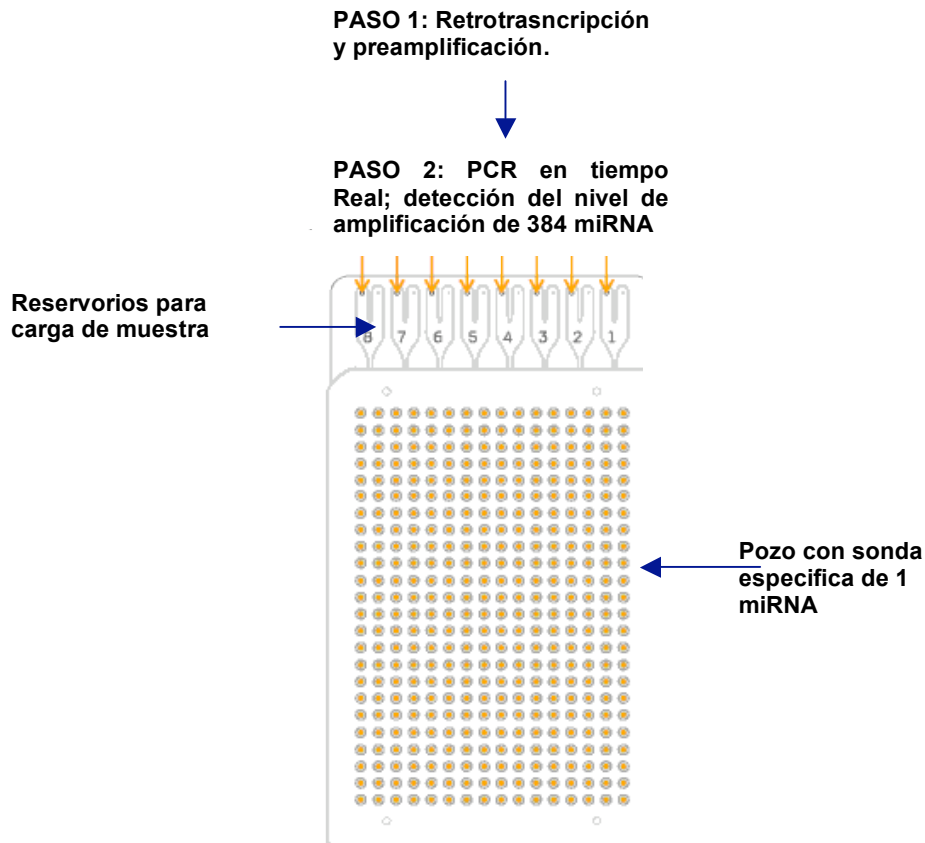


Figura 6. Esquema del arreglo TLDA para análisis de miRNA en tiempo real. El arreglo contiene 384 pozos con sondas fluorescentes específicas para medir simultáneamente el nivel de expresión de 373 miRNA, los RNA nucleolares: *MammU6*, *RNU44* y *RNU48* (controles endógenos positivos) y para los miRNA: *ath-miR159a*, *mmu-miR-672*, *mmu-miR-674*, *mmu-miR-871* y *mmu-miR-872* (controles negativos).

7. RESULTADOS.

7.1. Extracción de RNA y selección de muestras para cuantificación de microRNA.

Inicialmente se realizó el asilamiento de RNA a partir de 30 muestras de orina de pacientes con diagnóstico de CaP y 30 con diagnóstico de HPB. La concentración de RNA recuperado resultó ser muy variable. Del total de muestras estudiadas, se seleccionaron sólo aquellas con una concentración superior a 50 ng/μL, para un total de 9 muestras del grupo de CaP y 9 del grupo de HPB. La cantidad del RNA aislado

se evaluó por medición de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. La relación 260nm/280nm en las muestras seleccionadas fue inferior a 1.5 y superior a 0.7. Para la reacción de RT, la cantidad de RNA empleada se ajustó a 75 ng. Con el objetivo de incrementar el número de copias de cada miRNA y mejorar su detección durante la reacción de PCR en tiempo real, se efectuó por triplicado la reacción de pre-amplificación selectiva para miRNA. Es comprensible que la concentración de ácidos nucleicos en un fluido como la orina sea menor que la que se tiene en tejidos, por lo cual la pre-amplificación fué especialmente útil en nuestro caso.

7.2. Cuantificación relativa y expresión diferencial de microRNA en cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna.

Se realizó la cuantificación de 373 miRNA por PCR en tiempo real. Para obtener los datos de Ct de cada miRNA detectado en el ensayo, se empleó el *software RQ manager 2.1* del mismo fabricante del arreglo. A fin de lograr un análisis confiable, se consideró la presencia en orina, sólo de aquellos miRNA con un valor de Ct menor a 35. De los 373 miRNA que se analizaron, 50 mostraron expresión en las 18 réplicas (100%) que se realizaron. Adicionalmente, se observó que 178 miRNA no mostraron expresión detectable en ninguna replica. El análisis de cuantificación relativa se realizó con empleo del método comparativo $Ct \rightarrow 2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) como se describe en el apéndice A. El primer paso consiste en la normalización de la expresión de miRNA, para lo cual se seleccionan los controles endógenos más adecuados como referencias, con base en la estabilidad de su nivel de expresión. El algoritmo empleado para la selección de un control óptimo calcula la diferencia de valores de Ct (ΔCt) de cada control candidato con respecto a otros controles y determina la desviación estándar de todos los valores de ΔCt para ese control específico. El promedio de los resultados de desviación estándar para un control determinado es empleado como una medida de la estabilidad de ese mismo control; cuanto más pequeño es dicho valor, mayor es la estabilidad. Los RNA nucleares de tamaño pequeño *RNU48* y *MammU6*, cuya expresión es constitutiva en mamíferos, fueron los más estables; con valores de estabilidad de 2.8671 y 2.4547, respectivamente (Figura 7). Para el cálculo de la normalización, se utilizó la media

aritmética de los controles endógenos seleccionados para disminuir la contribución de los valores extremos al error del método de cuantificación. Es importante notar que la utilidad de la normalización radica en el hecho de que a pesar del cuidado que se tuvo en cargar la misma cantidad teórica de RNA en todas las replicas, es inevitable un cierto margen de variación en cuanto a la cantidad empleada realmente. La selección de controles endógenos, también permite reducir el error debido a dicha diferencia en la cantidad de RNA empleada al inicio del proceso.

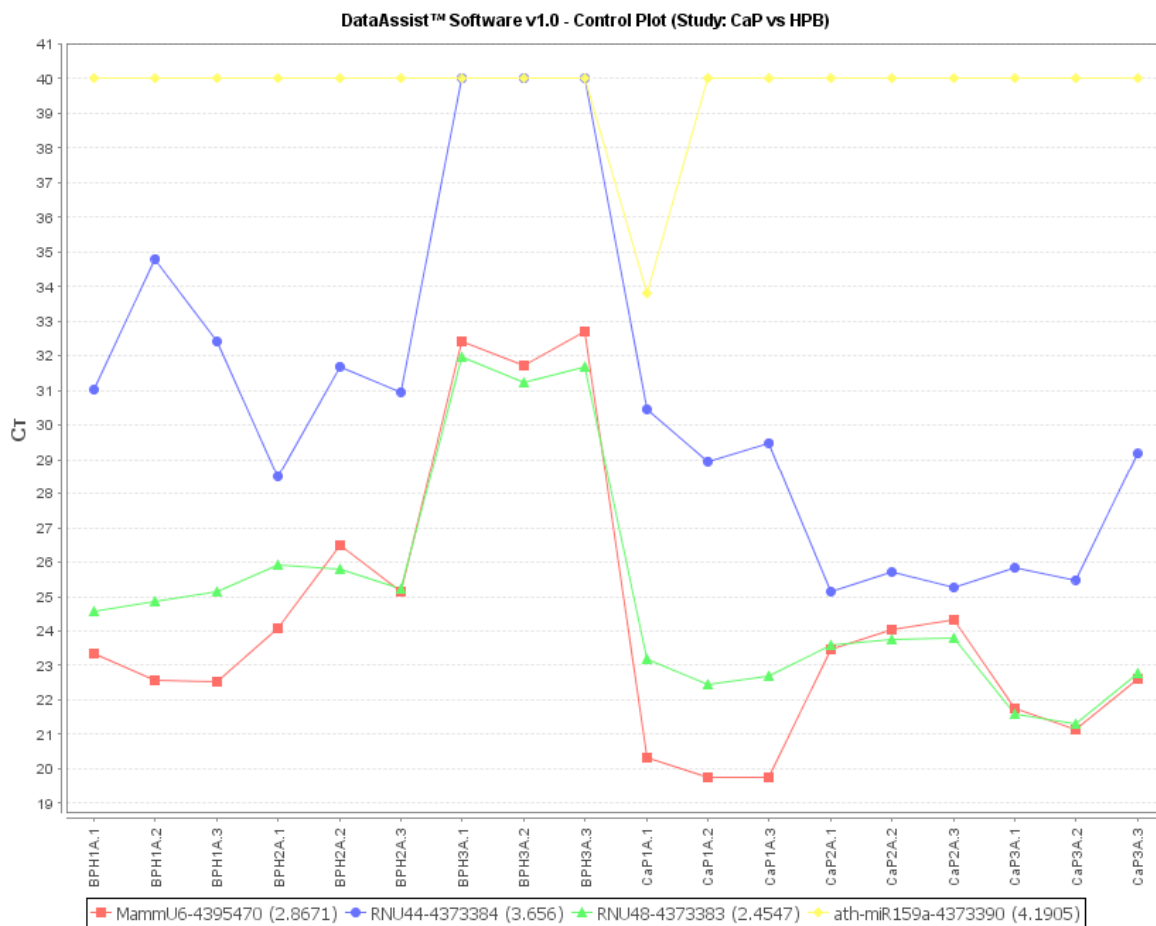


Figura 7. Expresión de los controles endógenos *RNU48* y *MammU6*, empleados como normalizadores para el análisis comparativo de Ct de miRNA. En el eje de las ordenadas se grafica el valor de Ct y en el eje de abscisas, las muestras estudiadas.

Finalmente, para determinar la diferencia de expresión de miRNA entre CaP y HPB se realizó una comparación entre los perfiles de expresión de ambas condiciones. Se consideraron los miRNA con un cambio en el nivel de expresión mayor a 2 en las muestra de CaP con respecto a las de HPB (esto es, que la expresión como mínimo se duplica ó se reduce a la mitad) y un valor de $P < 0.05$, calculado mediante una prueba de t (t-student). Con base en los criterios mencionados determinamos un conjunto de 21 miRNA que presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. El cambio en el nivel de expresión y los valores de P para los 21 miRNA con diferencias significativas de expresión se muestran en la tabla 2 y se representan gráficamente en la figura 8. De este grupo de miRNA, 19 se encuentran sobre-expresados, mientras que únicamente dos muestran una disminución de su expresión en CaP.

Para verificar que el conjunto de miRNA con diferencias significativas de expresión efectivamente permite distinguir entre los grupos de muestras de CaP y HPB, se realizó un agrupamiento jerárquico no supervisado de los bloques de muestras. El agrupamiento no supervisado permite organizar los bloques de muestras de acuerdo a la similitud o diferencia del perfil de expresión de miRNA, colocando los bloques con perfiles semejantes juntos. La relación entre grupos y miRNA se esquematiza gráficamente como un dendograma en el cual la distancia o longitud entre las ramas está determinada por el nivel de correlación entre los resultados de la expresión de un conjunto de miRNA. El perfil de 21 miRNA seleccionados permite realizar una separación adecuada entre las 3 muestras del grupo de CaP y las 3 del grupo de HPB (Figura 9). Debido al tamaño de la muestra, sólo se establece una correlación entre el perfil de expresión de miRNA y la condición patológica de cada grupo, sin pretender estratificar las muestras de CaP de acuerdo al grado de tumor o su pronóstico.

Tabla 2. MiRNA con diferencia significativa de expresión en CaP y su localización cromosómica. El cambio en el nivel de expresión se determinó empleando el método comparativo Ct (método $2^{-\Delta\Delta Ct}$). Una diferencia significativa en la expresión de miRNA se determinó cuando esta fue al menos dos veces mayor o menor en CaP (Fch= 2) con respecto a HPB, con un valor estadístico de p P<0.05. *Los controles endógenos por separado se mantiene relativamente estables y sin cambio significativo en sus niveles de expresión entre ambos grupos.

miRNA	Cambio en la expresión (Fch)	Valor-P
<i>MammU6*</i>	1.1	0.6
<i>RNU48*</i>	0.9	0.6
<i>miR-196b</i>	64.0	<0.001
<i>miR-574-3p</i>	2.5	<0.001
<i>let-7g</i>	38.0	0.002
<i>miR-200b</i>	8.0	0.003
<i>miR-149</i>	157.0	0.006
<i>let-7c</i>	8.0	0.007
<i>miR-20b</i>	21.0	0.008
<i>miR-17</i>	9.8	0.008
<i>miR-184</i>	13.0	0.008
<i>let-7b</i>	14.9	0.01
<i>miR-20a</i>	10.6	0.01
<i>miR-106a</i>	29.9	0.02
<i>miR-671-3p</i>	14.9	0.02
<i>let-7d</i>	16.0	0.02
<i>miR-148a</i>	29.9	0.03
<i>miR-429</i>	6.5	0.03
<i>let-7e</i>	22.6	0.03
<i>miR-31</i>	9.8	0.03
<i>miR-100</i>	7.5	0.04
<i>miR-150</i>	-7.5	<0.01
<i>miR-328</i>	-4.6	0.03

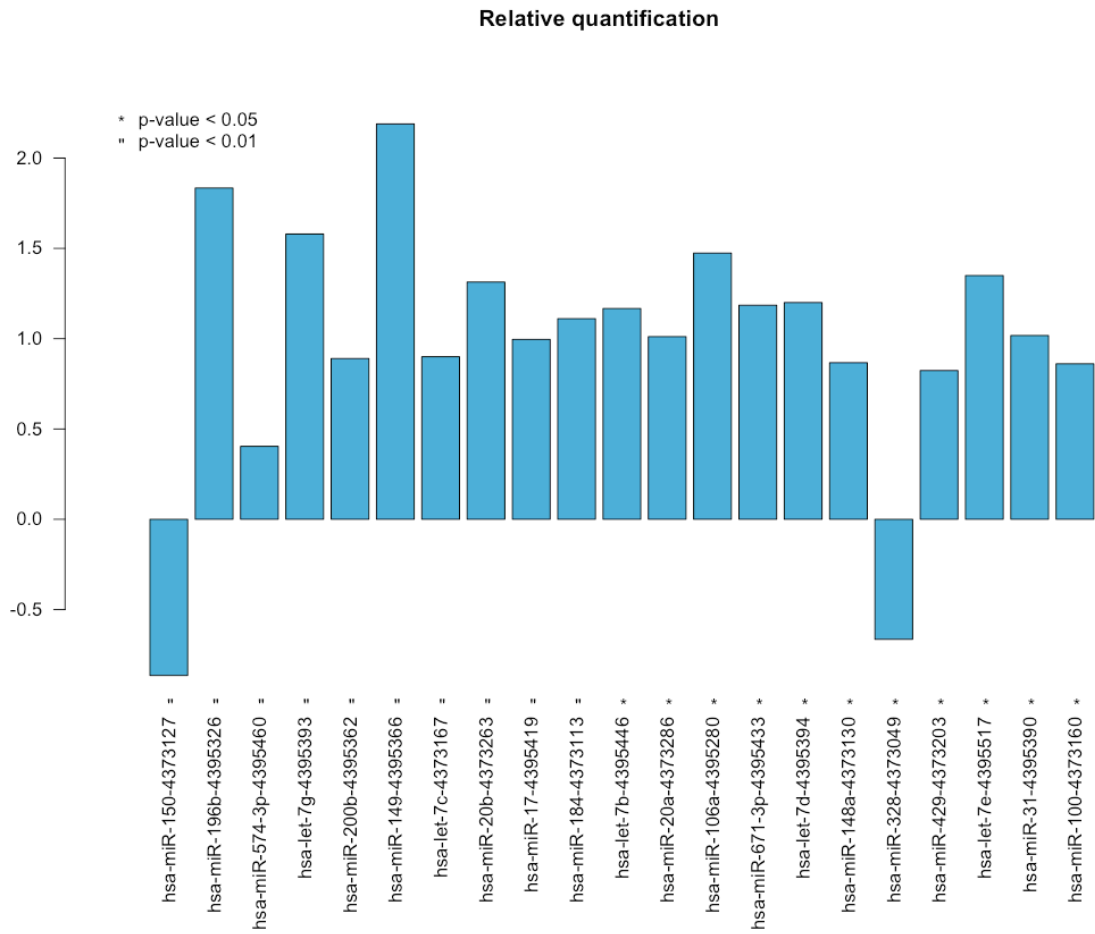


Figura 8. Gráfica de cuantificación relativa de 21 microRNA con diferencias significativas de expresión en el grupo de CaP con referencia al grupo de HPB. En el eje de las ordenadas se grafica el Log10 del cambio en el nivel de expresión.

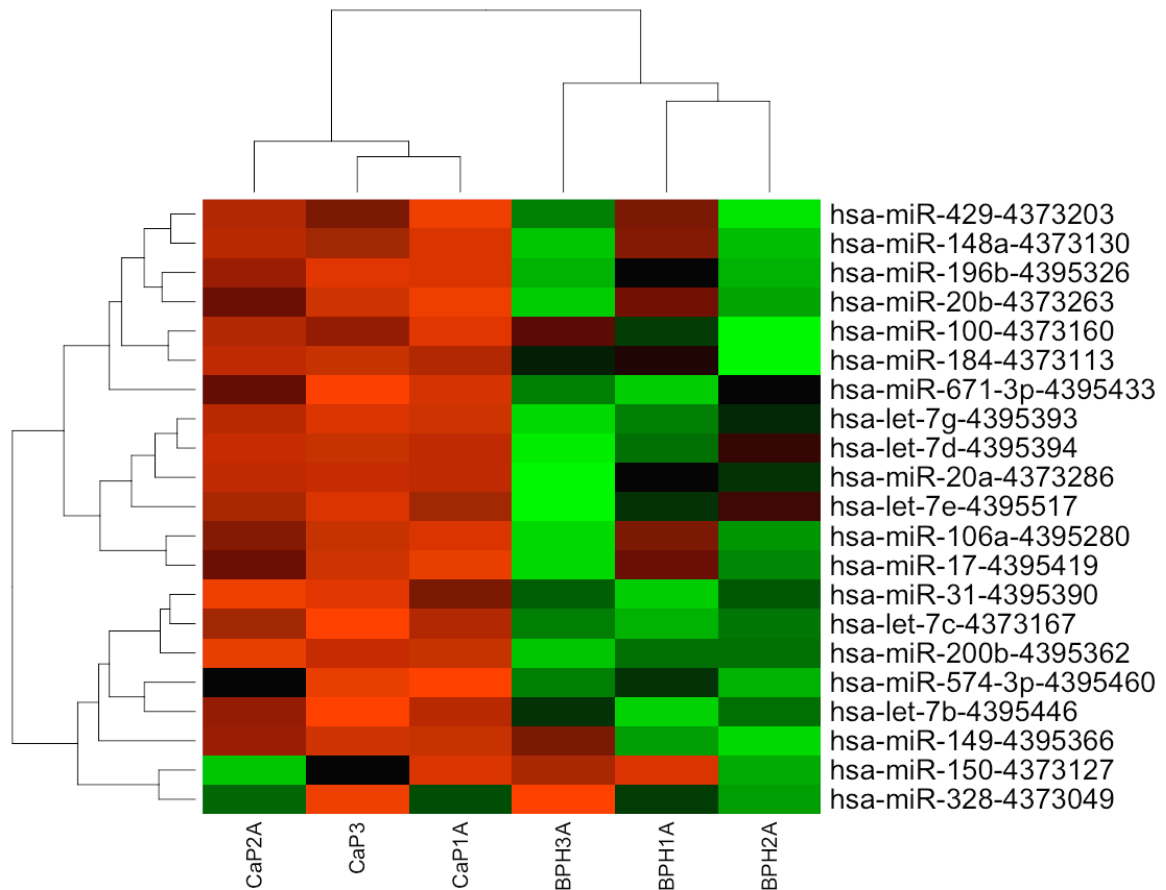


Figura 9. Mapa de calor mostrando el agrupamiento jerárquico no supervisado basado en el grupo de microRNA que muestran diferencias significativas de expresión entre el grupo de CaP y el de HPB. El nivel de expresión se representa por un código de color. Sub-expresión (verde), sobre-expresión (rojo), sin cambio (negro).

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Reportes previos de diversos grupos han mostrado que es factible utilizar mRNA aislado de orina como marcadores de cáncer de próstata. Particularmente, la determinación del mRNA no codificante *PCA3* ha mostrado una sensibilidad y una especificidad de 0.69 y 0.86, respectivamente (Groskopf et al., 2006) . El poder para discriminar entre CaP y otro tipo de neoplasias no malignas como la HPB se incrementa considerablemente con el uso combinado de diferentes marcadores

(Laxman et al., 2008). Las firmas de expresión de miRNA tienen una utilidad potencial en el diagnóstico, pronóstico y predicción de la respuesta terapéutica en diversos tipos de enfermedades humanas, incluyendo afecciones cardíacas (Latronico et al., 2007), infecciones virales (Houzet et al., 2008), enfermedades inflamatorias (Bi et al., 2009) y cáncer (Croce, 2009). En su mayoría, los estudios que asocian a los miRNA con cáncer han empleado muestras de piezas quirúrgicas, de biopsias, líneas celulares de CaP (Ambs et al., 2008; Lu et al., 2005; Porkka et al., 2007; Tong and Nemunaitis, 2008; Volinia et al., 2006); o han utilizado miRNA extraído de tejidos fijados con formalina y embebidos en parafina (Liu et al., 2009). Por otra parte, existen varios trabajos que describen miRNA que son específicos para diferentes tipos de cáncer y la relación entre la expresión de miRNA con el estadio del cáncer (Calin and Croce, 2006; Croce, 2009; Garzon et al., 2006). Estos estudios han demostrado la utilidad de los miRNA en el diagnóstico y pronóstico de diferentes tipos de cáncer; así como, en la diferenciación entre neoplasias benignas y las de tipo maligno. Se han logrado avances en el desarrollo de métodos para el estudio de miRNA presentes en tejidos de órganos y en células. Sin embargo, aún se desconoce mucho acerca de su presencia en fluidos; hecho que ha limitado su posible uso diagnóstico. Recientemente, se reportó un estudio en donde se muestra la elevación significativa de miRNA en mujeres embarazadas con respecto a las no-embarazadas (Gilad et al., 2008). En otro estudio se demostró la presencia de miRNA de origen placentario en plasma de la madre (Chim et al., 2008). En adición a estos estudios, se ha demostrado que fluidos como la sangre (Mitchell et al., 2008), la saliva (Park et al., 2009) e incluso la orina (Hanke et al., 2009) contienen miRNA en cantidad detectable y que dichas moléculas se encuentran en una forma relativamente estable y protegidas de la degradación. En particular el estudio de Mitchell y colaboradores (2008), determinó que miR-141 podía diferenciar a individuos con CaP de individuos sanos. En otro trabajo de Taylor y Gercel-Taylor (2008), se realizó la extracción de miRNA a partir de exosomas aislados de muestras séricas de pacientes con cáncer de ovario. La estrategia empleada permitió identificar ocho miRNA que se encuentran sobre-expresados

en cáncer. El trabajo de Hanke (2009), es el único a la fecha que ha reportado la extracción y cuantificación de miRNA en muestras de orina de pacientes con cáncer de vejiga. A pesar de todos estos resultados, no existe un ensayo de la evaluación del perfil de expresión de miRNA en orina de pacientes con CaP.

Con base en la evidencia anterior, en este trabajo se realizó la extracción, identificación y cuantificación de miRNA en muestras de orina de pacientes con CaP e HPB. De manera general, el rendimiento de la extracción muestra una gran variabilidad entre las muestras analizadas. La variabilidad en la cantidad de RNA recuperado puede ser explicada por la diferencia interindividual en la cantidad de células prostáticas que se descaman y vierten a la orina. Con la finalidad de disminuir el efecto de dicha diferencia, se decidió formar bloques de muestras para el análisis de expresión de miRNA. Para determinar si existe un conjunto de miRNA potencialmente útiles como marcadores específicos de CaP, se realizó una comparación del perfil de expresión de miRNA entre ambos grupos. De manera general, se determinó que 50 miRNA se expresan en cantidad detectable en todas las muestras. Se logró determinar un grupo de 21 miRNA que muestran diferencias significativas entre los grupos del estudio. De este conjunto, identificamos sobre-expresión de 19 miRNA (*miR-196b*, *-574-3p*, *let-7b*, *-7c*, *-7d*, *7e*, *-7g*, *miR-200b*, *-149*, *-20b*, *-17*, *-184*, *-20a*, *-106a*, *-671-3p*, *-148a*, *-429*, *-31*, *-100*); y sólo dos mostraron estar sub-expresados (*miR-150*, *-328*). El agrupamiento jerárquico que se representa en el mapa de calor de la figura 7 muestra que este perfil de miRNA de orina permiten separar a las muestras del grupo de CaP de las del grupo de HPB. Nuestros resultados muestran tanto similitudes como diferencias con estudios previos de perfiles de miRNA para CaP realizados a partir de tejidos. Particularmente; *miR-184*, *miR-106a*, *miR-20a* y *let-7d* también fueron reportados por Volinia et al. (2006) como sobre expresados en CaP con respecto al tejido normal prostático. El estudio de Porkka et al. (2008) también revela que *miR-184* se encuentra sobre-expresado. Por el contrario, en el mismo trabajo se reporta a *let-7b*, *-7c*, *-7d* y *-7g* como sub-expresados, lo cual difiere con nuestros datos. El estudio más cercano de perfiles de expresión de

miRNA en fluidos para CaP es el desarrollado por Mitchell et al. (2008). Ellos encontraron una regulación a la alta de un grupo de 5 miRNA en circulación. Resulta interesante destacar el caso de miR-100, cuya expresión se encuentra significativamente elevada, al igual que en nuestro perfil. Sin embargo, en los estudios de expresión de miRNA realizados en tejidos, este mismo miRNA es reportado en varias ocasiones como sub-expresado. Un aspecto interesante a destacar de todos estos estudios, es el hecho de que los patrones de expresión de miRNA en circulación y en fluidos como la orina, parecen ser considerablemente distintos de los observados en muestras de tejido y líneas celulares. En nuestro estudio encontramos mayoritariamente una expresión incrementada de varios miRNA en muestras de CaP. En concordancia con nuestros resultados, el estudio de Mitchell et al (2008) y el realizado por Park et al (2009) en saliva también muestran una sobre-expresión de miRNA. Esta discrepancia entre los patrones de expresión de miRNA en tejido y en fluidos puede deberse a diversos factores. De manera directa podemos inferir que las diferentes técnicas experimentales y métodos de análisis contribuyen a las diferencias observadas entre los diferentes perfiles. Otra posibilidad es que la presencia miRNA en circulación y en fluidos sea producto de procesos como la lisis de las células tumorales. Más aun, recientemente se ha demostrado que los miRNA son transportados activamente en vesículas de tamaño nanométrico denominadas exosomas y que son secretados en mayor medida por las células de cáncer. Por lo anterior, es posible que los exosomas sean una fuente importante de miRNA en fluidos (Taylor and Gercel-Taylor, 2008). Es evidente que la falta de concordancia entre los diferentes perfiles de expresión y el hecho de que la información sobre el uso de miRNA como biomarcadores esté asociada principalmente con estudios en muestras de tejidos sólidos y líneas celulares; plantea una limitación para la utilización de miRNA obtenidos de fluidos en el diagnóstico y pronóstico para diversas patologías como el cáncer. Lo anterior plantea la necesidad de definir una firma molecular que sea representativa del estado de las células de cáncer, en un contexto biológico determinado. En años recientes, el descubrimiento de la regulación genética dependiente de miRNA en eucariontes ha motivado el

planteamiento de nuevas estrategias de investigación que permitan elucidar los rasgos importantes de sus funciones biológicas, tanto en el desarrollo celular normal como en el que da lugar a patologías en humanos. Día con día se incrementa el número de miRNA descubiertos en diferentes tipos de células, y con ello, la evidencia acerca de su papel regulatorio. Las estimaciones actuales predicen que cerca del 30% de los genes humanos se encuentran regulados por algún miRNA (Rajewsky, 2006) y que cada miRNA tiene aproximadamente 200 transcritos blanco, en vertebrados. Más aun, diferentes combinaciones de miRNA pueden estar expresadas en distintos tipos de células y pueden regular de manera coordinada genes que son específicos de un tipo celular y un tejido en especial (Brennecke et al., 2005; Krek et al., 2005). En el perfil de expresión diferencial de este trabajo se encontró a *miR106b*, que está sobre-expresado en diferentes tipos de neoplasias malignas. Este miRNA ha sido asociado a diferentes genes que regulan el ciclo celular. Entre sus transcritos blanco posibles, destaca el inhibidor de cinasa dependiente de ciclina *p21/CDKN1A*. Reprimiendo la expresión de p21, miR-106b contribuye a la proliferación celular en cáncer (Ivanovska et al., 2008). Otro ejemplo es miR-196b, que en células progenitoras de médula ósea conduce a un incremento de la capacidad de proliferación, supervivencia y pérdida de diferenciación celular; contribuyendo, de esta manera, al desarrollo de leucemia (Coskun et al., 2010). Otro miRNA interesante del perfil que se generó en este trabajo es *miR-150*. Es ampliamente reconocido su papel en la diferenciación de linfocitos. En este contexto, un blanco interesante de *miR-150* es el factor de transcripción c-Myb (Lin et al., 2008). Sin embargo, también se ha identificado a *miR-150* como un promotor de cáncer gástrico, al reprimir la expresión del factor pro-apoptótico EGR2 (Wu et al., 2010). Resulta lógico pensar que *miR-150* es un oncogén en tejido gástrico; no obstante, en este trabajo encontramos que se encuentra sub-expresado en CaP. De manera semejante, los miRNA de la familia let-7 han sido ampliamente reportados como reguladores de oncogenes que participan en vías como las de *RAS* y *HMGA2* (Johnson et al., 2007; Johnson et al., 2005). Por otra parte, *miR-200b* y *miR-429*, ambos miembros de la familia de miRNA que incluye además a *miR-200a* y *miR-200c*; han sido identificados como

reguladores de los genes *ZEB1* y *ZEB2*, que actúan como represores de la transcripción de caderina-E, promoviendo así, la capacidad de migración e invasividad durante la progresión del CaP (Gregory et al., 2008). A pesar de la información existente respecto al papel biológico y los blancos moleculares de los miRNA que hemos encontrado diferencialmente expresados, quizá lo más significativo sea el estudio de aquellos miRNA cuya función y papel en la patogénesis del CaP no se conoce todavía. Por otra parte, es importante considerar que la regulación de la expresión génica mediada por miRNA está determinada no únicamente por el nivel de expresión de dichas moléculas, sino por un número de factores que conducen a su acción molecular. Tal es el caso de la alteración en la expresión de la proteína AGO2, cuya cantidad determina el nivel de degradación de los transcritos blanco (Brennecke et al., 2005; Krek et al., 2005; Liu et al., 2004). Finalmente, los datos de este estudio deben ser confirmados mediante la validación individual de la expresión de los miRNA significativamente alterados; utilizando un conjunto de muestras adicionales, bien documentadas en cuanto a sus rasgos clínico-patológicos.

9. CONCLUSIONES.

En este trabajo se demostró la posibilidad de realizar el aislamiento y purificación de miRNA a partir de muestras de orina. Mediante un análisis de cuantificación relativa se determinó un grupo de 21 miRNA que mostraron diferencia de expresión significativa en el grupo de muestras de CaP con respecto al de HPB. Este perfil diferencial de miRNA permitió realizar la separación de los dos grupos de estudio. En suma, los resultados de este trabajo indican que la detección y cuantificación de miRNA en orina es útil en la identificación de nuevos marcadores moleculares para CaP. El reto a continuación es validar ese conjunto de miRNA marcadores con la finalidad de establecer, de manera oportuna, grupos de pronóstico que permitan orientar las decisiones terapéuticas en el tratamiento de los pacientes con enfermedad prostática y realizar una predicción adecuada de su evolución.

10. PERSPECTIVAS.

- Entre las perspectivas a futuro de este proyecto se contempla ampliar el estudio de perfiles de expresión de miRNA en orina, utilizando un conjunto de muestras de pacientes con diagnóstico de CaP andrógeno dependiente y de pacientes con diagnóstico de CaP andrógeno independiente.
- Identificar un conjunto de miRNA candidatos como marcadores de CaP andrógeno dependiente y CaP andrógeno independiente; y validar su expresión en muestras de tejido embebidas en parafina y fijadas en formalina.
- Estudiar el papel funcional de los miRNA candidatos como posibles biomarcadores, sobre la transición de las células de CaP hacia la independencia de andrógenos.
- Establecer la utilidad de una firma molecular en orina, basada en los miRNA validados y caracterizados funcionalmente y verificar su utilidad como biomarcadores de CaP andrógeno dependiente y CaP andrógeno independiente en un conjunto de muestras clínicas alternativo.

11. BIBLIOGRAFÍA.

1. Ambros, S., Preußner, R.L., Yi, M., Hudson, R.S., Howe, T.M., Petrocca, F., Wallace, T.A., Liu, C.G., Volinia, S., Calin, G.A., Yfantis, H.G., Stephens, R.M., and Croce, C.M. (2008). Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res.* 68, 6162-6170.
2. Asangani, I.A., Rasheed, S.A., Nikolova, D.A., Leupold, J.H., Colburn, N.H., Post, S., and Allgayer, H. (2008). MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 27, 2128-2136.

3. Bi,Y., Liu,G., and Yang,R. (2009). MicroRNAs: novel regulators during the immune response. *J. Cell Physiol* 218, 467-472.
4. Brennecke,J., Hipfner,D.R., Stark,A., Russell,R.B., and Cohen,S.M. (2003). bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* 113, 25-36.
5. Brennecke,J., Stark,A., Russell,R.B., and Cohen,S.M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS. Biol.* 3, e85.
6. Bushati,N. and Cohen,S.M. (2007). microRNA functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 175-205.
7. Bussemakers,M.J., van,B.A., Verhaegh,G.W., Smit,F.P., Karthaus,H.F., Schalken,J.A., Debruyne,F.M., Ru,N., and Isaacs,W.B. (1999). DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.* 59, 5975-5979.
8. Cai,X., Hagedorn,C.H., and Cullen,B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* 10, 1957-1966.
9. Calin,G.A. and Croce,C.M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* 6, 857-866.
10. Calin,G.A., Dumitru,C.D., Shimizu,M., Bichi,R., Zupo,S., Noch,E., Aldler,H., Rattan,S., Keating,M., Rai,K., Rassenti,L., Kipps,T., Negrini,M., Bullrich,F., and Croce,C.M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 15524-15529.
11. Calin,G.A., Ferracin,M., Cimmino,A., Di,L.G., Shimizu,M., Wojcik,S.E., Iorio,M.V., Visone,R., Sever,N.I., Fabbri,M., Iuliano,R., Palumbo,T., Pichiorri,F., Roldo,C., Garzon,R., Sevignani,C., Rassenti,L., Alder,H.,

- Volinia,S., Liu,C.G., Kipps,T.J., Negrini,M., and Croce,C.M. (2005). A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1793-1801.
12. Calin,G.A., Liu,C.G., Sevignani,C., Ferracin,M., Felli,N., Dumitru,C.D., Shimizu,M., Cimmino,A., Zupo,S., Dono,M., Dell'Aquila,M.L., Alder,H., Rassenti,L., Kipps,T.J., Bullrich,F., Negrini,M., and Croce,C.M. (2004). MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 11755-11760.
13. Chim,S.S., Shing,T.K., Hung,E.C., Leung,T.Y., Lau,T.K., Chiu,R.W., and Lo,Y.M. (2008). Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin. Chem.* **54**, 482-490.
14. Cimmino,A., Calin,G.A., Fabbri,M., Iorio,M.V., Ferracin,M., Shimizu,M., Wojcik,S.E., Aqeilan,R.I., Zupo,S., Dono,M., Rassenti,L., Alder,H., Volinia,S., Liu,C.G., Kipps,T.J., Negrini,M., and Croce,C.M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 13944-13949.
15. Coskun,E., von der Heide,E.K., Schlee,C., Kuhn,A., Gokbuget,N., Hoelzer,D., Hofmann,W.K., Thiel,E., and Baldus,C.D. (2010). The role of microRNA-196a and microRNA-196b as ERG regulators in acute myeloid leukemia and acute T-lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.*
16. Croce,C.M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 704-714.
17. De Marzo,A.M., Meeker,A.K., Zha,S., Luo,J., Nakayama,M., Platz,E.A., Isaacs,W.B., and Nelson,W.G. (2003). Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology* **62**, 55-62.

18. De Marzo,A.M., Platz,E.A., Sutcliffe,S., Xu,J., Gronberg,H., Drake,C.G., Nakai,Y., Isaacs,W.B., and Nelson,W.G. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 7, 256-269.
19. DeMarzo,A.M., Nelson,W.G., Isaacs,W.B., and Epstein,J.I. (2003). Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet* 361, 955-964.
20. Fabian,M.R., Sonenberg,N., and Filipowicz,W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 351-379.
21. Filipowicz,W., Bhattacharyya,S.N., and Sonenberg,N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102-114.
22. Garcia,M., Jemal,A., Ward,E.M., Center,M.M., Hao,Y., Siegel,R.L., and Thun,M.J. (2007). *Global Cancer Facts & Figures 2007*. American Cancer Society.
23. Garzon,R., Pichiorri,F., Palumbo,T., Iuliano,R., Cimmino,A., Aqeilan,R., Volinia,S., Bhatt,D., Alder,H., Marcucci,G., Calin,G.A., Liu,C.G., Bloomfield,C.D., Andreeff,M., and Croce,C.M. (2006). MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 5078-5083.
24. Gilad,S., Meiri,E., Yogev,Y., Benjamin,S., Lebanony,D., Yerushalmi,N., Benjamin,H., Kushnir,M., Cholakh,H., Melamed,N., Bentwich,Z., Hod,M., Goren,Y., and Chajut,A. (2008). Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS. One.* 3, e3148.
25. Gregory,P.A., Bert,A.G., Paterson,E.L., Barry,S.C., Tsykin,A., Farshid,G., Vadas,M.A., Khew-Goodall,Y., and Goodall,G.J. (2008). The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat. Cell Biol.* 10, 593-601.

26. Groskopf,J., Aubin,S.M., Deras,I.L., Blase,A., Bodrug,S., Clark,C., Brentano,S., Mathis,J., Pham,J., Meyer,T., Cass,M., Hodge,P., Macairan,M.L., Marks,L.S., and Rittenhouse,H. (2006). APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin. Chem.* 52, 1089-1095.
27. Hanke,M., Hoefig,K., Merz,H., Feller,A.C., Kausch,I., Jocham,D., Warnecke,J.M., and Sczakiel,G. (2009). A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol. Oncol.*
28. Hayashita,Y., Osada,H., Tatematsu,Y., Yamada,H., Yanagisawa,K., Tomida,S., Yatabe,Y., Kawahara,K., Sekido,Y., and Takahashi,T. (2005). A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 65, 9628-9632.
29. Houzet,L., Yeung,M.L., de,L., V, Desai,D., Smith,S.M., and Jeang,K.T. (2008). MicroRNA profile changes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seropositive individuals. *Retrovirology.* 5, 118.
30. INEGI. **Estadísticas a Proposito del dia mundial contra el cancer 2009.**
31. Ivanovska,I., Ball,A.S., Diaz,R.L., Magnus,J.F., Kibukawa,M., Schelter,J.M., Kobayashi,S.V., Lim,L., Burchard,J., Jackson,A.L., Linsley,P.S., and Cleary,M.A. (2008). MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression. *Mol. Cell Biol.* 28, 2167-2174.
32. Johnson,C.D., Esquela-Kerscher,A., Stefani,G., Byrom,M., Kelnar,K., Ovcharenko,D., Wilson,M., Wang,X., Shelton,J., Shingara,J., Chin,L., Brown,D., and Slack,F.J. (2007). The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res.* 67, 7713-7722.

33. Johnson,S.M., Grosshans,H., Shingara,J., Byrom,M., Jarvis,R., Cheng,A., Labourier,E., Reinert,K.L., Brown,D., and Slack,F.J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120, 635-647.
34. Joshua,A.M., Evans,A., Van der Kwast,T., Zielenska,M., Meeker,A.K., Chinnaiyan,A., and Squire,J.A. (2008). Prostatic preneoplasia and beyond. *Biochim. Biophys. Acta* 1785, 156-181.
35. Kim,V.N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 376-385.
36. Krek,A., Grun,D., Poy,M.N., Wolf,R., Rosenberg,L., Epstein,E.J., Macmenamin,P., da,P., I, Gunsalus,K.C., Stoffel,M., and Rajewsky,N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* 37, 495-500.
37. Lagos-Quintana,M., Rauhut,R., Lendeckel,W., and Tuschl,T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-858.
38. Latronico,M.V., Catalucci,D., and Condorelli,G. (2007). Emerging role of microRNAs in cardiovascular biology. *Circ. Res.* 101, 1225-1236.
39. Laxman,B., Morris,D.S., Yu,J., Siddiqui,J., Cao,J., Mehra,R., Lonigro,R.J., Tsodikov,A., Wei,J.T., Tomlins,S.A., and Chinnaiyan,A.M. (2008). A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res.* 68, 645-649.
40. Lee,R.C., Feinbaum,R.L., and Ambros,V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
41. Lee,Y.S. and Dutta,A. (2007). The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev.* 21, 1025-1030.

42. Lin,Y.C., Kuo,M.W., Yu,J., Kuo,H.H., Lin,R.J., Lo,W.L., and Yu,A.L. (2008). c-Myb is an evolutionary conserved miR-150 target and miR-150/c-Myb interaction is important for embryonic development. *Mol. Biol. Evol.* 25, 2189-2198.
43. Liu,A., Tetzlaff,M.T., Vanbelle,P., Elder,D., Feldman,M., Tobias,J.W., Sepulveda,A.R., and Xu,X. (2009). MicroRNA expression profiling outperforms mRNA expression profiling in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2, 519-527.
44. Liu,J., Carmell,M.A., Rivas,F.V., Marsden,C.G., Thomson,J.M., Song,J.J., Hammond,S.M., Joshua-Tor,L., and Hannon,G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441.
45. Livak,K.J. and Schmittgen,T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
46. Lu,J., Getz,G., Miska,E.A., Alvarez-Saavedra,E., Lamb,J., Peck,D., Sweet-Cordero,A., Ebert,B.L., Mak,R.H., Ferrando,A.A., Downing,J.R., Jacks,T., Horvitz,H.R., and Golub,T.R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834-838.
47. Lund,E., Guttinger,S., Calado,A., Dahlberg,J.E., and Kutay,U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95-98.
48. Meng,F., Henson,R., Wehbe-Janek,H., Ghoshal,K., Jacob,S.T., and Patel,T. (2007). MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 133, 647-658.
49. Mitchell,P.S., Parkin,R.K., Kroh,E.M., Fritz,B.R., Wyman,S.K., Pogosova-Agadjanyan,E.L., Peterson,A., Noteboom,J., O'Briant,K.C., Allen,A., Lin,D.W., Urban,N., Drescher,C.W., Knudsen,B.S., Stirewalt,D.L., Gentleman,R., Vessella,R.L., Nelson,P.S., Martin,D.B., and Tewari,M.

- (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *105*, 10513-10518.
50. Oelke,M. and Gravas,S. (2010). Relevance of benign prostatic hyperplasia and associated conditions for urologists, health care systems, and society. *World J. Urol.*
 51. Park,N.J., Zhou,H., Elashoff,D., Henson,B.S., Kastratovic,D.A., Abemayor,E., and Wong,D.T. (2009). Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin. Cancer Res.* *15*, 5473-5477.
 52. Parker,R. and Sheth,U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol. Cell* *25*, 635-646.
 53. Pienta,K.J. and Bradley,D. (2006). Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* *12*, 1665-1671.
 54. Porkka,K.P., Pfeiffer,M.J., Waltering,K.K., Vessella,R.L., Tammela,T.L., and Visakorpi,T. (2007). MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res.* *67*, 6130-6135.
 55. Rajewsky,N. (2006). microRNA target predictions in animals. *Nat. Genet.* *38 Suppl*, S8-13.
 56. Rajewsky,N. and Socci,N.D. (2004). Computational identification of microRNA targets. *Dev. Biol.* *267*, 529-535.
 57. Reynolds,M.A., Kastury,K., Groskopf,J., Schalken,J.A., and Rittenhouse,H. (2007). Molecular markers for prostate cancer. *Cancer Lett.* *249*, 5-13.
 58. Ro,S., Park,C., Young,D., Sanders,K.M., and Yan,W. (2007). Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res.* *35*, 5944-5953.

59. Roehrborn,C.G. (2005). Benign prostatic hyperplasia: an overview. *Rev. Urol. 7 Suppl 9*, S3-S14.
60. Rubin,M.A. and De Marzo,A.M. (2004). Molecular genetics of human prostate cancer. *Mod. Pathol. 17*, 380-388.
61. Rubin,M.A., Zhou,M., Dhanasekaran,S.M., Varambally,S., Barrette,T.R., Sanda,M.G., Pienta,K.J., Ghosh,D., and Chinnaiyan,A.M. (2002). alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA 287*, 1662-1670.
62. Schulz,W.A., Burchardt,M., and Cronauer,M.V. (2003). Molecular biology of prostate cancer. *Mol. Hum. Reprod. 9*, 437-448.
63. Taylor,D.D. and Gercel-Taylor,C. (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol. 110*, 13-21.
64. Tomlins,S.A., Laxman,B., Varambally,S., Cao,X., Yu,J., Helgeson,B.E., Cao,Q., Prensner,J.R., Rubin,M.A., Shah,R.B., Mehra,R., and Chinnaiyan,A.M. (2008). Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia. 10*, 177-188.
65. Tong,A.W., Fulgham,P., Jay,C., Chen,P., Khalil,I., Liu,S., Senzer,N., Eklund,A.C., Han,J., and Nemunaitis,J. (2009). MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. *Cancer Gene Ther. 16*, 206-216.
66. Tong,A.W. and Nemunaitis,J. (2008). Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy? *Cancer Gene Ther. 15*, 341-355.
67. Vasudevan,S., Tong,Y., and Steitz,J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science 318*, 1931-1934.

68. Volinia,S., Calin,G.A., Liu,C.G., Ambs,S., Cimmino,A., Petrocca,F., Visone,R., Iorio,M., Roldo,C., Ferracin,M., Prueitt,R.L., Yanaihara,N., Lanza,G., Scarpa,A., Vecchione,A., Negrini,M., Harris,C.C., and Croce,C.M. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 2257-2261.
69. Wightman,B., Ha,I., and Ruvkun,G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* *75*, 855-862.
70. Wu,Q., Jin,H., Yang,Z., Luo,G., Lu,Y., Li,K., Ren,G., Su,T., Pan,Y., Feng,B., Xue,Z., Wang,X., and Fan,D. (2010). MiR-150 promotes gastric cancer proliferation by negatively regulating the pro-apoptotic gene *EGR2*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *392*, 340-345.
71. You,J., Cozzi,P., Walsh,B., Willcox,M., Kearsley,J., Russell,P., and Li,Y. (2010). Innovative biomarkers for prostate cancer early diagnosis and progression. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* *73*, 10-22.
72. Zhu,S., Wu,H., Wu,F., Nie,D., Sheng,S., and Mo,Y.Y. (2008). MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res.* *18*, 350-359.

APENDICE.

Calculo del cambio de expresión por el método comparativo Ct.

En esta apartado se explica brevemente el procedimiento matemático para el cálculo del método comparativo Ct, como ha sido desarrollado por Livak y Schmittgen (2001) para análisis de cuantificación relativa por PCR en tiempo real. El cambio en el nivel de expresión de un gen determinado se expresa de la siguiente manera:

$$\text{Cambio de expresión} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Esta forma de la ecuación se utiliza para comparar la expresión de un gen en dos muestras diferentes (A y B); cada muestra se normaliza con respecto a un control interno ó normalizador, calculando la diferencia de valores de Ct (ΔCt) de la siguiente manera:

$$\Delta Ct_{\text{muestra A}} = Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{control interno}}$$

Lo mismo se aplica para la muestra B. Posteriormente, se calcula la diferencia de valores de ΔCt , entre las muestras ($\Delta\Delta Ct$). Supongamos para este ejemplo, que la muestra problema es A y el calibrador ó muestra control es la B:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra A}} - \Delta Ct_{\text{muestra B}}$$

Finalmente se determina el cambio en el nivel de expresión del gen de interés en A con respecto a B, calculando el antilogaritmo base 2 del $-\Delta\Delta Ct$.

$$\text{Cambio de expresión} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$